

**Accession Nbr :**

2000-319322 [28]

**Sec. Acc. CPI :**

C2000-096986

**Title :**

New nucleic acid sequence encoding Alcaligenes faecalis nitrilase polypeptide useful for converting racemic nitriles to chiral carboxylic acids

**Derwent Classes :**

B05 C03 D16

**Patent Assignee :**

(ABBO ) ABBOTT GMBH & CO KG  
(BADI ) BASF AG

**Inventor(s) :**

ENGELS D; FRIEDRICH T; HAUER B; MATTES R; RESS-LOESCHKE M;  
RESS-LOSCHKE M

**Nbr of Patents :**

15

**Nbr of Countries :**

91

**Patent Number :**

DE19848129 A1 20000420 DW2000-28 C12N-015/55 27p \*  
AP: 1998DE-1048129 19981019

WO200023577 A1 20000427 DW2000-29 C12N-009/78 Ger

AP: 1999WO-EP07679 19991013

DSNW: AE AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY CA CH CN CR CU CZ DE DK  
DM EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC  
LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX NO NZ PL PT RO RU SD  
SE SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZW

DSRW: AT BE CH CY DE DK EA ES FI FR GB GH GM GR IE IT KE LS LU MC  
MW NL OA PT SD SE SL SZ TZ UG ZW

AU9964708 A 20000508 DW2000-37 C12N-009/78

FD: Based on WO200023577  
AP: 1999AU-0064708 19991013

NO200101912 A 20010418 DW2001-38 C12N-009/78

AP: 1999WO-EP07679 19991013; 2001NO-0001912 20010418

BR9914629 A 20010626 DW2001-40 C12N-009/78

FD: Based on WO200023577  
AP: 1999BR-0014629 19991013; 1999WO-EP07679 19991013

*This Page Blank (uspto)*

EP1123386 A1 20010816 DW2001-47 C12N-009/78 Ger  
FD: Based on WO200023577  
AP: 1999EP-0952558 19991013; 1999WO-EP07679 19991013  
DSR: AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT RO SE SI

KR2001085938 A 20010907 DW2002-18 C12N-015/55  
AP: 2001KR-0704906 20010419

CZ200101382 A3 20020313 DW2002-23 C12N-009/78  
FD: Based on WO200023577  
AP: 1999WO-EP07679 19991013; 2001CZ-0001382 19991013

CN1331743 A 20020116 DW2002-30 C12N-009/78  
AP: 1999CN-0814765 19991013

MX2001003893 A1 20010601 DW2002-35 C12N-001/21  
AP: 2001MX-0003893 20010418

HU200104802 A2 20020429 DW2002-38 C12N-009/78  
FD: Based on WO200023577  
AP: 1999WO-EP07679 19991013; 2001HU-0004802 19991013

JP2002527106 W 20020827 DW2002-71 C12N-015/09 53p  
FD: Based on WO200023577  
AP: 1999WO-EP07679 19991013; 2000JP-0577288 19991013

ZA200104066 A 20020731 DW2002-71 C12N-000/00 80p  
AP: 2001ZA-0004066 20010518

AU-765480 B 20030918 DW2003-70 C12N-009/78  
FD: Previous Publ. AU9964708; Based on WO200023577  
AP: 1999AU-0064708 19991013

US6869783 B1 20050322 DW2005-21 C12P-007/62  
FD: Based on WO200023577  
AP: 1999WO-EP07679 19991013; 2001US-0806876 20010405

#### Priority Details :

1998DE-1048129 19981019

#### IPC s :

C12N-000/00 C12N-001/21 C12N-009/78 C12N-015/09 C12N-015/55 C12P-007/62  
C07H-021/04 C12N-005/10 C12N-015/63 C12P-007/40 C12P-007/42 C12P-041/00  
C12R-001/05 C12R-001:05 C12R-001:19 C12R-001:38 C12N-009:78

#### Abstract :

DE19848129 A

NOVELTY - An isolated nucleic acid sequence (I) encoding an Alcaligenes faecalis nitrilase polypeptide is new.

DETAILED DESCRIPTION - An isolated nucleic acid sequence (I) encoding a polypeptide with nitrilase activity is selected from:

This Page Blank (uspto)

- (1) a defined genomic DNA sequence (seq1) of 1071 base pairs (bp) given in the specification;
- (2) nucleic acid sequences derived from seq1 as a result of the degeneracy of the genetic code; and
- (3) derivatives of seq1 that code for a polypeptide with a defined sequence of 356 amino acids and have at least 95% homology at the amino acid level without essentially reducing the enzymatic activity of the polypeptide (sic).

INDEPENDENT CLAIMS are also included for:

- (1) an amino acid sequence encoded by (I);
- (2) a nucleic acid construct (II) comprising (I) linked to one or more regulatory sequences;
- (3) a vector containing (I) or (II);
- (4) a microorganism containing (I) or (II);
- (5) a process for preparing chiral carboxylic acids of formula (III), comprising converting a racemic nitrile of formula (IV) in the presence of an amino acid sequence as in (1) or a growing, resting or digested microorganism as in (4), where the nitrile conversion is at least 25 mmoles/hour per mg protein or 25 mmoles/hour per g dry weight.

R1-R3 = H, optionally substituted 1-10C alkyl, 2-10C alkenyl, optionally substituted aryl, heteroaryl, OR4 or NR4R5, provided that R1-R3 are all different;

R4 = H, optionally substituted 1-10C alkyl, 2-10C alkenyl, 2-11C alkanoyl, 3-11C alkenoyl, aryl, aroyl, heteroaryl or heteroaroyl; and

R5 = H, optionally substituted 1-10C alkyl, 2-10C alkenyl, aryl or heteroaryl.

USE - The polypeptide encoded by (I), or a growing, resting or digested microorganism containing (I) is useful for preparing chiral carboxylic acids (III) by conversion of racemic nitriles (IV). (III) are useful as intermediates, e.g. for pharmaceuticals and plant protection agents. (Dwg.0/6)

**Manual Codes :**

CPI: B04-E02E B04-E08 B04-F0100E B04-L0500E B07-H B10-B04A B10-B04B B10-C04 C04-E02E C04-E08 C04-F0100E C04-L0500E C07-H C10-B04A C10-B04B C10-C04 D05-C12 D05-H12A D05-H12B2 D05-H12E D05-H14A1 D05-H17A6

**Update Basic :**

2000-28

**Update Equivalents :**

2000-29; 2000-37; 2001-38; 2001-40; 2001-47; 2002-18; 2002-23; 2002-30; 2002-35; 2002-38; 2002-71; 2003-70; 2005-21

**Update Equivalents (Monthly) :**

2001-07; 2001-08; 2002-03; 2002-04; 2002-05; 2002-06; 2002-11; 2003-10; 2005-04

This Page Blank (uspto)



(19) BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES

PATENT- UND

MARKENAMT

(12) **Offenlegungsschrift**  
(10) **DE 198 48 129 A 1**

(51) Int. Cl. 7:

**C 12 N 15/55**

C 12 N 15/63

C 12 N 1/21

C 07 H 21/04

C 12 N 9/78

C 12 P 41/00

C 12 P 7/40

(21) Aktenzeichen: 198 48 129.2

(22) Anmeldetag: 19. 10. 1998

(43) Offenlegungstag: 20. 4. 2000

(71) Anmelder:

BASF AG, 67063 Ludwigshafen, DE

(72) Erfinder:

Ress-Löschke, Marion, Dr., 69221 Dossenheim, DE;  
Friedrich, Thomas, Dr., 64283 Darmstadt, DE;  
Hauer, Bernhard, Dr., 67136 Fußgönheim, DE;  
Matthes, Ralf, Prof. Dr., 70569 Stuttgart, DE; Engels,  
Dirk, Dr., 70569 Stuttgart, DE

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

(54) Verfahren zur Herstellung chiraler Carbonsäuren aus Nitrilen mit Hilfe einer Nitrilase oder Mikroorganismen, die ein Gen für die Nitrilase enthalten

(57) Die Erfindung betrifft Nukleinsäuresequenzen, die für ein Polypeptid mit Nitrilaseaktivität codieren, Nukleinsäurekonstrukte enthaltend die Nukleinsäuresequenzen sowie Vectoren enthaltend die Nukleinsäuresequenzen oder die Nukleinsäurekonstrukte. Die Erfindung betrifft weiterhin Aminosäuresequenzen, die durch die Nukleinsäuresequenzen codiert werden und Mikroorganismen enthaltend die Nukleinsäuresequenzen, die Nukleinsäurekonstrukte oder Vectoren enthaltend, die Nukleinsäuresequenzen oder die Nukleinsäurekonstrukte. Außerdem betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung chiraler Carbonsäuren aus den racemischen Nitrilen.

# DE 198 48 129 A 1

## Beschreibung

Die Erfinbung betrifft Nukleinsäuresequenzen, die für ein Polypeptid mit Nitrilaseaktivität codieren, Nukleinsäurekonstrukte enthaltend die Nukleinsäuresequenzen sowie Vectoren enthaltend die Nukleinsäuresequenzen oder die Nukleinsäurekonstrukte. Die Erfinbung betrifft weiterhin Aminosäuresequenzen, die durch die Nukleinsäuresequenzen codiert werden und Mikroorganismen enthaltend die Nukleinsäuresequenzen, die Nukleinsäurekonstrukte oder Vectoren enthaltend die Nukleinsäuresequenzen oder die Nukleinsäurekonstrukte.

Außerdem betrifft die Erfinbung ein Verfahren zur Herstellung chiraler Carbonsäuren aus den racemischen Nitrilen.

Chirale Carbonsäuren sind gesuchte Verbindungen für die organischen Synthesechemie. Sie sind Ausgangsprodukte für eine Vielzahl von pharmazeutischen Wirkstoffen oder Wirkstoffen für den Pflanzenschutz. Chirale Carbonsäuren können zur klassischen Racematspaltung über Diastereomerersalze verwendet werden. So wird R-(–)- oder S-(–)-Mandelsäure beispielsweise zur Racematspaltung racemischer Amine eingesetzt. R-(–)-Mandelsäure wird außerdem als Zwischenprodukt bei der Synthese halbsynthetischer Antibiotika und einer Vielzahl landwirtschaftlicher Produkte genutzt wird.

Aus der Literatur sind eine Reihe verschiedener Synthesezugänge zu chiralen Carbonsäuren bekannt. So werden beispielsweise optisch aktive Aminosäuren technisch über fermentative Verfahren gewonnen. Von Nachteil dabei ist, daß für jede Aminosäure ein eigenes Verfahren entwickelt werden muß. Um eine möglichst breite Palette verschiedener Verbindungen herstellen zu können, werden deshalb chemische oder enzymatische Verfahren verwendet. Nachteilig bei den chemischen Verfahren ist, daß das Stereozentrum in der Regel in mehrstufigen, nicht breit anwendbaren Synthese umständlich aufgebaut werden muß.

Die enzymatische Synthese chiraler Carbonsäuren sind einer Reihe von Patenten oder Patentanmeldungen zu entnehmen. WO 92/05275 beschreibt die Synthese enantiomerer  $\alpha$ -Hydroxy- $\alpha$ -alkyl- oder  $\alpha$ -Alkylcarbonsäuren in Gegenwart biologischen Materials. In EP-B-0 348 901 wird ein Verfahren zur Herstellung von optisch aktiven  $\alpha$ -substituierten organischen Säuren mit Mikroorganismen der Gattungen Alcaligenes, Pseudomonas, Rhodopseudomonas, Corynebacterium sp. Stamm KO-2-4, Acinetobacter, Bacillus, Mycobacterium, Rhodococcus und Candida beansprucht. Die Herstellung von L- $\alpha$ -Aminosäuren wird mit Mikroorganismen wird in EP-B-0 332 379 beansprucht.

Die Herstellung von  $\alpha$ -Hydroxycarbonsäuren speziell die Herstellung von optisch aktiver Milchsäure oder Mandelsäure mit verschiedenen Mikroorganismen wie Mikroorganismen der Gattungen Alcaligenes, Aureobacterium, Pseudomonas, Rhodopseudomonas, Corynebacterium, Acinetobacter, Caseobacter, Bacillus, Mycobacterium, Rhodococcus, Brevibacterium, Nocardia, Variovorax, Arthrobacter und Candida oder mit Enzymen wird in den Schutzrechten EP-A-0 348 901 oder seinem US-Äquivalent US 5,283,193, EP-B-0 473 328, EP-B-0 527 553 oder seinem US-Äquivalent US 5,296,373, EP-A-0 610 048, EP-A-0 610 049, EP-A-0 666 320 oder WO 97/32030 beschrieben.

Von Nachteil bei diesen Prozessen ist, daß sie häufig nur zu Produkten mit einer geringen optischen Reinheit führen und/oder daß sie nur mit geringen Raum-Zeit-Ausbeuten ablaufen. Dies führt zu wirtschaftlich unattraktiven Prozessen. Auch der Versuch durch Zugabe von Substanzen wie Sulfit, Disulfit, Dithionit, Hypophosphit oder Phosphit die Produktivität zu erhöhen (siehe EP-A-0 486 289) oder über die Verwendung von Mikroorganismen, die eine erhöhte Resistenz gegenüber  $\alpha$ -Hydroxynitrilen aufweisen (siehe WO 97/32030), führt zu keiner nennenswerten Steigerung der Produktivität.

Es war daher die Aufgabe der Erfinbung ein leichtes, kostengünstiges, breit anwendbares Verfahren zur Herstellung von optisch aktiven, chiralen Carbonsäuren zu entwickeln, das die oben genannten Nachteile nicht aufweist.

Diese Aufgabe wurde durch das erfundungsgemäße Verfahren zur Herstellung von chiralen Carbonsäuren der allgemeinen Formel I



dadurch gekennzeichnet, daß man racemische Nitrile der allgemeinen Formel II



55 in Gegenwart einer Aminosäuresequenz, die codiert wird durch eine Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz ableiten,
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 80% Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne daß die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich reduziert ist,

65 oder einem wachsenden, ruhenden oder aufgeschlossenen Mikroorganismus, der entweder eine Nukleinsäuresequenz aus der oben genannten Gruppe oder ein Nukleinsäurekonstrukt, das eine Nukleinsäure aus der genannten Gruppe mit einem oder mehreren Regulationssignalen verknüpft, enthält, umsetzt und wobei mindestens 25 mmol Nitril/h pro mg Protein oder 25 mmol Nitril/h pro g Trockengewicht zu den chiralen Carbonsäuren umgesetzt werden,

# DE 198 48 129 A 1

wobei die Substituenten und Variablen in den Formeln I und II folgende Bedeutung haben:

\* ein optisch aktives Zentrum

$R^1, R^2, R^3$  unabhängig voneinander Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes  $C_1-C_{10}$ -Alkyl-,  $C_2-C_{10}$ -Alkenyl-, substituiertes oder unsubstituiertes Aryl-, Hetaryl-,  $OR^4$  oder  $NR^4R^5$  und wobei die Reste  $R^1, R^2$  und  $R^3$  immer unterschiedlich sind,

5

$R^4$  Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes  $C_1-C_{10}$ -Alkyl-,  $C_2-C_{10}$ -Alkenyl-,  $C_1-C_{10}$ -Alkylcarbonyl-,  $C_2-C_{10}$ -Alkenylcarbonyl-, Aryl-, Arylcarbonyl-, Hetaryl- oder Hetarylcarbonyl-,

$R^5$  Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes  $C_1-C_{10}$ -Alkyl-,  $C_2-C_{10}$ -Alkenyl-, Aryl- oder Hetaryl-, gelöst.

10

$R^1, R^2, R^3$  bezeichnen in den Verbindungen der Formeln I und II unabhängig voneinander Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes  $C_1-C_{10}$ -Alkyl-,  $C_2-C_{10}$ -Alkenyl-, substituiertes oder unsubstituiertes Aryl-, Hetaryl-,  $OR^4$  oder  $NR^4R^5$  und wobei die Reste  $R^1, R^2$  und  $R^3$  immer unterschiedlich sind.

Als Alkylreste seien substituierte oder unsubstituierte verzweigte oder unverzweigte  $C_1-C_{10}$ -Alkylketten wie beispielsweise Methyl, Ethyl, n-Propyl, 1-Methylethyl, n-Butyl, 1-Methylpropyl, 2-Methylpropyl, 1,1-Dimethylethyl, n-Pentyl, 1-Methylbutyl, 2-Methylbutyl, 3-Methylbutyl, 2,2-Dimethylpropyl, 1-Ethylpropyl, n-Hexyl, 1,1-Dimethylpropyl, 1,2-Dimethylpropyl, 1-Methylpentyl, 2-Methylpentyl, 3-Methylpentyl, 4-Methylpentyl, 1,1-Dimethylbutyl, 1,2-Dimethylbutyl, 1,3-Dimethylbutyl, 2,2-Dimethylbutyl, 2,3-Dimethylbutyl, 3,3-Dimethylbutyl, 1-Ethylbutyl, 2-Ethylbutyl, 1,1,2-Trimethylpropyl, 1,2,2-Trimethylpropyl, 1-Ethyl-1-methylpropyl, 1-Ethyl-2-methylpropyl, n-Heptyl, n-Octyl, n-Nonyl oder n-Decyl genannt. Bevorzugt sind Methyl, Ethyl, n-Propyl, n-Butyl, i-Propyl oder i-Butyl.

15

Als Alkenylreste seien verzweigte oder unverzweigte  $C_2-C_{10}$ -Alkenylketten wie beispielsweise Ethenyl, Propenyl, 1-Butenyl, 2-Butenyl, 3-Butenyl, 2-Methylpropenyl, 1-Pentenyl, 2-Pentenyl, 3-Pentenyl, 4-Pentenyl, 1-Methyl-1-but enyl, 2-Methyl-1-but enyl, 3-Methyl-1-but enyl, 1-Methyl-2-but enyl, 2-Methyl-2-but enyl, 3-Methyl-2-but enyl, 1-Methyl-3-but enyl, 2-Methyl-3-but enyl, 3-Methyl-3-but enyl, 1,1-Dimethyl-2-propenyl, 1,2-Dimethyl-1-propenyl, 1,2-Dimethyl-2-propenyl, 1-Ethyl-1-propenyl, 1-Ethyl-2-propenyl, 1-Hexenyl, 2-Hexenyl, 3-Hexenyl, 4-Hexenyl, 5-Hexenyl, 1-Methyl-1-pentenyl, 2-Methyl-1-pentenyl, 3-Methyl-1-pentenyl, 4-Methyl-1-pentenyl, 1-Methyl-2-pentenyl, 2-Methyl-2-pentenyl, 3-Methyl-2-pentenyl, 4-Methyl-3-pentenyl, 1-Methyl-4-pentenyl, 2-Methyl-4-pentenyl, 3-Methyl-4-pentenyl, 4-Methyl-4-pentenyl, 1,1-Dimethyl-2-but enyl, 1,1-Dimethyl-3-but enyl, 1,2-Dimethyl-1-but enyl, 1,2-Dimethyl-2-but enyl, 1,2-Dimethyl-3-but enyl, 1,3-Dimethyl-1-but enyl, 1,3-Dimethyl-2-but enyl, 1,3-Dimethyl-3-but enyl, 2,2-Dimethyl-3-but enyl, 2,3-Dimethyl-1-but enyl, 2,3-Dimethyl-2-but enyl, 2,3-Dimethyl-3-but enyl, 3,3-Dimethyl-1-but enyl, 3,3-Dimethyl-2-but enyl, 1-Ethyl-1-but enyl, 1-Ethyl-2-but enyl, 1-Ethyl-3-but enyl, 2-Ethyl-1-but enyl, 2-Ethyl-2-but enyl, 2-Ethyl-3-but enyl, 1,1,2-Trimethyl-2-propenyl, 1-Ethyl-1-methyl-2-propenyl, 1-Ethyl-2-methyl-1-propenyl, 1-Ethyl-2-methyl-2-propenyl, 1-Heptenyl, 2-Heptenyl, 3-Heptenyl, 4-Heptenyl, 5-Heptenyl, 6-Heptenyl, 1-Octenyl, 2-Octenyl, 3-Octenyl, 4-Octenyl, 5-Octenyl, 6-Octenyl, 7-Octenyl, Nonenyl oder Dekenyl genannt. Bevorzugt sind Ethenyl, Propenyl, Butenyl oder Pentenyl.

20

Als Aryl- seien substituiertes und unsubstituiertes Arylreste, die 6 bis 20 Kohlenstoffatome im Ring oder Ringsystem enthalten genannt. Dabei kann es sich um aneinander kondensierte aromatische Ringe handeln oder um aromatische Ringe, die über Alkyl-, Alkylcarbonyl-, Alkenyl- oder Alkenylcarbonylketten, Carbonyl, Sauerstoff oder Stickstoff verbrückt sind. Die Arylreste können gegebenenfalls noch über eine  $C_1-C_{10}$ -Alkyl-,  $C_3-C_8$ -Alkenyl-,  $C_3-C_6$ -Alkinyl- oder  $C_3-C_8$ -Cycloalkylkette an das Grundgerüst gebunden sein. Bevorzugt sind Phenyl oder Naphtyl.

25

Als Hetaryl- seien substituierte oder unsubstituierte, einfache oder kondensierte aromatische Ringsysteme mit einem oder mehreren heteroaromatischen 3- bis 7gliedrigen Ringen, die ein oder mehrere Heteroatome wie N, O oder S enthalten können und gegebenenfalls über eine  $C_1-C_{10}$ -Alkyl-,  $C_3-C_8$ -Alkenyl- oder  $C_3-C_8$ -Cycloalkylkette an das Grundgerüst gebunden sein können, genannt. Beispiele für derartige Hetarylreste sind Pyrazol, Imidazol, Oxazol, Isooxazol, Thiazol, Triazol, Pyridin, Chinolin, Isochinolin, Acridin, Pyrimidin, Pyridazin, Pyrazin, Phenazin, Purin oder Pteridin. Die Hetarylreste können über die Heteroatome oder über die verschiedenen Kohlenstoffatome im Ring oder Ringsystem oder über die Substituenten an das Grundgerüst gebunden sein. Bevorzugt sind Pyridin, Imidazol, Pyrimidin, Purin, Pyrazin oder Chinolin.

30

Als Substituenten der genannten Reste von  $R^1, R^2$  oder  $R^3$  kommen beispielsweise ein oder mehrere Substituenten wie Halogen wie Fluor, Chlor oder Brom, Thio, Nitro, Amino, Hydroxy, Alkyl, Alkoxy, Alkenyl, Alkenyloxy, Alkinyloxy oder weitere aromatischen oder weitere gesättigte oder ungesättigte nicht aromatische Ringen oder Ringsystemen in Frage. Bevorzugt sind Alkylreste wie  $C_1-C_6$ -Alkyl wie Methyl, Ethyl, Propyl oder Butyl, Aryl wie Phenyl, Halogen wie Chlor, Fluor oder Brom, Hydroxy oder Amino.

35

$R^4$  bezeichnet in den Resten  $OR^4$  oder  $NR^4R^5$  Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes  $C_1-C_{10}$ -Alkyl-,  $C_2-C_{10}$ -Alkenyl-,  $C_1-C_{10}$ -Alkylcarbonyl-,  $C_2-C_{10}$ -Alkenylcarbonyl-, Aryl-, Arylcarbonyl-, Hetaryl- oder Hetarylcarbonyl.

40

Als Alkylreste seien substituierte oder unsubstituierte verzweigte oder unverzweigte  $C_1-C_{10}$ -Alkylketten wie beispielsweise Methyl, Ethyl, n-Propyl, 1-Methylethyl, n-Butyl, 1-Methylpropyl, 2-Methylpropyl, 1,1-Dimethylethyl, n-Pentyl, 1-Methylbutyl, 2-Methylbutyl, 3-Methylbutyl, 2,2-Dimethylpropyl, 1-Ethylpropyl, n-Hexyl, 1,1-Dimethylpropyl, 1,2-Dimethylpropyl, 1-Methylpentyl, 2-Methylpentyl, 3-Methylpentyl, 4-Methylpentyl, 1,1-Dimethylbutyl, 1,2-Dimethylbutyl, 1,3-Dimethylbutyl, 2,2-Dimethylbutyl, 2,3-Dimethylbutyl, 3,3-Dimethylbutyl, 1-Ethylbutyl, 2-Ethylbutyl, 1,1,2-Trimethylpropyl, 1,2,2-Trimethylpropyl, 1-Ethyl-1-methylpropyl, 1-Ethyl-2-methylpropyl, n-Heptyl, n-Octyl, n-Nonyl oder n-Decyl genannt. Bevorzugt sind Methyl, Ethyl, n-Propyl, n-Butyl, i-Propyl oder i-Butyl.

45

Als Alkenylreste seien verzweigte oder unverzweigte  $C_2-C_{10}$ -Alkenylketten wie beispielsweise Ethenyl, Propenyl, 1-Butenyl, 2-Butenyl, 3-Butenyl, 2-Methylpropenyl, 1-Pentenyl, 2-Pentenyl, 3-Pentenyl, 4-Pentenyl, 1-Methyl-1-but enyl, 2-Methyl-1-but enyl, 3-Methyl-1-but enyl, 1-Methyl-2-but enyl, 2-Methyl-2-but enyl, 3-Methyl-2-but enyl, 1-Methyl-3-but enyl, 2-Methyl-3-but enyl, 3-Methyl-3-but enyl, 1,1-Dimethyl-2-propenyl, 1,2-Dimethyl-1-propenyl, 1,2-Dimethyl-2-propenyl, 1-Ethyl-1-propenyl, 1-Ethyl-2-propenyl, 1-Hexenyl, 2-Hexenyl, 3-Hexenyl, 4-Hexenyl, 5-Hexenyl, 1-Methyl-1-pentenyl, 2-Methyl-1-pentenyl, 3-Methyl-1-pentenyl, 4-Methyl-1-pentenyl, 1-Methyl-2-pentenyl, 2-Methyl-2-pentenyl-

50

# DE 198 48 129 A 1

nyl, 3-Methyl-2-pentenyl, 4-Methyl-2-pentenyl, 1-Methyl-3-pentenyl, 2-Methyl-3-pentenyl, 3-Methyl-3-pentenyl, 4-Methyl-3-pentenyl, 1-Methyl-4-pentenyl, 2-Methyl-4-pentenyl, 3-Methyl-4-pentenyl, 4-Methyl-4-pentenyl, 1,1-Dimethyl-2-but enyl, 1,1-Dimethyl-3-but enyl, 1,2-Dimethyl-1-but enyl, 1,2-Dimethyl-2-but enyl, 1,2-Dimethyl-3-but enyl, 1,3-Dimethyl-3-but enyl, 1,3-Dimethyl-2-but enyl, 1,3-Dimethyl-1-but enyl, 2,2-Dimethyl-3-but enyl, 2,3-Dimethyl-1-but enyl, 2,3-Dimethyl-2-but enyl, 2,3-Dimethyl-3-but enyl, 3,3-Dimethyl-1-but enyl, 3,3-Dimethyl-2-but enyl, 1-Ethyl-1-but enyl, 1-Ethyl-2-but enyl, 1-Ethyl-3-but enyl, 2-Ethyl-1-but enyl, 2-Ethyl-2-but enyl, 2-Ethyl-3-but enyl, 1,1,2-Trimethyl-2-propenyl, 1-Ethyl-1-methyl-2-propenyl, 1-Ethyl-2-methyl-1-propenyl, 1-Ethyl-2-methyl-2-propenyl, 1-Heptenyl, 2-Heptenyl, 3-Heptenyl, 4-Heptenyl, 5-Heptenyl, 6-Heptenyl, 1-Octenyl, 2-Octenyl, 3-Octenyl, 4-Octenyl, 5-Octenyl, 6-Octenyl, 7-Octenyl, Nonenyl oder Dekenyl genannt. Bevorzugt sind Ethenyl, Propenyl, Butenyl oder Pentenyl.

5 Als Alkylcarbonylreste seien substituierte oder unsubstituierte verzweigte oder unverzweigte C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkylcarbonylketten wie beispielsweise Methylcarbonyl, Ethylcarbonyl, n-Propylcarbonyl, 1-Methylethylcarbonyl, n-Butylcarbonyl, 1-Methylpropylcarbonyl-, 2-Methylpropylcarbonyl, 1,1-Dimethylethylcarbonyl, n-Pentylcarbonyl, 1-Methylbutylcarbonyl, 2-Methylbutylcarbonyl, 3-Methylbutylcarbonyl, 2,2-Dimethylpropylcarbonyl, 1-Ethylpropylcarbonyl, n-Hexylcarbonyl, 1,1-Dimethylpropylcarbonyl, 1,2-Dimethylpropylcarbonyl, 1-Methylpentylcarbonyl, 2-Methylpentylcarbonyl, 3-Methylpentylcarbonyl, 4-Methylpentylcarbonyl, 1,1-Dimethylbutylcarbonyl, 1,2-Dimethylbutylcarbonyl, 1,3-Dimethylbutylcarbonyl, 2,2-Dimethylbutylcarbonyl, 2,3-Dimethylbutylcarbonyl, 3,3-Dimethylbutylcarbonyl, 1-Ethylbutylcarbonyl, 2-Ethylbutylcarbonyl, 1,1,2-Trimethylpropylcarbonyl, 1,2,2-Trimethylpropylcarbonyl, 1-Ethyl-1-methylpropylcarbonyl, 1-Ethyl-2-methylpropylcarbonyl, n-Heptylcarbonyl, n-Octylcarbonyl, n-Nonylcarbonyl oder n-Decylcarbonyl genannt. Bevorzugt sind Methylcarbonyl, Ethylcarbonyl, n-Propylcarbonyl, n-Butylcarbonyl, i-Propylcarbonyl oder i-Butylcarbonyl.

10 Als Alkenylcarbonylreste seien verzweigte oder unverzweigte C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-Alkenylcarbonylketten wie beispielsweise Ethenylcarbonyl, Propenylcarbonyl, 1-Butenylcarbonyl, 2-Butenylcarbonyl, 3-Butenylcarbonyl, 2-Methylpropenylcarbonyl, 1-Pentenylcarbonyl, 2-Pentenylcarbonyl, 3-Pentenylcarbonyl, 4-Pentenylcarbonyl, 1-Methyl-1-but enylcarbonyl, 2-Methyl-1-but enylcarbonyl, 3-Methyl-1-but enylcarbonyl, 1-Methyl-2-but enylcarbonyl, 2-Methyl-2-but enylcarbonyl, 3-Methyl-2-but enylcarbonyl, 1-Methyl-3-but enylcarbonyl, 2-Methyl-3-but enylcarbonyl, 3-Methyl-3-but enylcarbonyl, 1,1-Dimethyl-2-propenylcarbonyl, 1,2-Dimethyl-1-propenylcarbonyl, 1,2-Dimethyl-2-propenylcarbonyl, 1-Ethyl-1-propenylcarbonyl, 1-Ethyl-2-propenylcarbonyl, 1-Hexenylcarbonyl, 2-Hexenylcarbonyl, 3-Hexenylcarbonyl, 4-Hexenylcarbonyl, 5-Hexenylcarbonyl, 1-Methyl-1-pentenylcarbonyl, 2-Methyl-1-pentenylcarbonyl, 3-Methyl-1-pentenylcarbonyl, 4-Methyl-1-pentenylcarbonyl, 1-Methyl-2-pentenylcarbonyl, 2-Methyl-2-pentenylcarbonyl, 3-Methyl-2-pentenylcarbonyl, 4-Methyl-2-pentenylcarbonyl, 1-Methyl-3-pentenylcarbonyl, 2-Methyl-4-pentenylcarbonyl, 3-Methyl-4-pentenylcarbonyl, 4-Methyl-4-pentenylcarbonyl, 1,1-Dimethyl-2-but enylcarbonyl, 1,1-Dimethyl-3-but enylcarbonyl, 1,2-Dimethyl-1-but enylcarbonyl, 1,2-Dimethyl-2-but enylcarbonyl, 1,2-Dimethyl-3-but enylcarbonyl, 1,3-Dimethyl-1-but enylcarbonyl, 1,3-Dimethyl-2-but enylcarbonyl, 1,3-Dimethyl-3-but enylcarbonyl, 2,2-Dimethyl-3-but enylcarbonyl, 2,3-Dimethyl-1-but enylcarbonyl, 2,3-Dimethyl-2-but enylcarbonyl, 2,3-Dimethyl-3-but enylcarbonyl, 3,3-Dimethyl-1-but enylcarbonyl, 3,3-Dimethyl-2-but enylcarbonyl, 1-Ethyl-1-but enylcarbonyl, 1-Ethyl-2-but enylcarbonyl, 1-Ethyl-3-but enylcarbonyl, 2-Ethyl-1-but enylcarbonyl, 2-Ethyl-2-but enylcarbonyl, 2-Ethyl-3-but enylcarbonyl, 1,1,2-Trimethyl-2-propenylcarbonyl, 1-Ethyl-1-methyl-2-propenylcarbonyl, 1-Ethyl-2-methyl-1-propenylcarbonyl, 1-Ethyl-2-methyl-2-propenylcarbonyl, 1-Heptenylcarbonyl, 2-Heptenylcarbonyl, 3-Heptenylcarbonyl, 4-Heptenylcarbonyl, 5-Heptenylcarbonyl, 6-Heptenylcarbonyl, 1-Octenylcarbonyl, 2-Octenylcarbonyl, 3-Octenylcarbonyl, 4-Octenylcarbonyl, 5-Octenylcarbonyl, 6-Octenylcarbonyl, 7-Octenylcarbonyl, Nonenylcarbonyl oder Dekenylcarbonyl genannt. Bevorzugt sind Ethenylcarbonyl, Propenylcarbonyl, Butenylcarbonyl oder Pentenylcarbonyl.

15 Als Aryl- seien substituiertes und unsubstituiertes Arylreste, die 6 bis 20 Kohlenstoffatome im Ring oder Ringsystem enthalten genannt. Dabei kann es sich um aneinander kondensierte aromatische Ringe handeln oder um aromatische Ringe, die über Alkyl-, Alkylcarbonyl-, Alkenyl- oder Alkenylcarbonylketten, Carbonyl, Sauerstoff oder Stickstoff verbrückt sind. Die Arylreste können gegebenenfalls noch über eine C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkyl-, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-Alkenyl-, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-Alkinyl- oder C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-Cycloalkylkette an das Grundgerüst gebunden sein. Bevorzugt sind Phenyl oder Naphthyl.

20 Als Arylcarbonyl- seien substituiertes und unsubstituiertes Arylcarbonylreste, die 6 bis 20 Kohlenstoffatome im Ring oder Ringsystem enthalten genannt. Dabei kann es sich um aneinander kondensierte aromatische Ringe handeln oder um aromatische Ringe, die über Alkyl-, Alkylcarbonyl-, Alkenyl- oder Alkenylcarbonylketten, Carbonyl, Sauerstoff oder Stickstoff verbrückt sind. Bevorzugt sind Phenylcarbonyl oder Naphthylcarbonyl.

25 Als Hetaryl- seien substituierte oder unsubstituierte, einfache oder kondensierte aromatische Ringsysteme mit einem oder mehreren heteroaromatischen 3- bis 7gliedrigen Ringen, die ein oder mehrere Heteroatome wie N, O oder S enthalten können und gegebenenfalls über eine C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkyl-, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-Alkenyl- oder C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-Cycloalkylkette an das Grundgerüst gebunden sein können, genannt. Beispiele für derartige Hetarylreste sind Pyrazol, Imidazol, Oxazol, Isooxazol, Thiazol, Triazol, Pyridin, Chinolin, Isochinolin, Acridin, Pyrimidin, Pyridazin, Pyrazin, Phenazin, Purin oder Pteridin. Die Hetarylreste können über die Heteroatome oder über die verschiedenen Kohlenstoffatome im Ring oder Ringsystem oder über die Substituenten an das Grundgerüst gebunden sein. Unter Hetarylcarbonylresten sind heteroaromatische Reste zu verstehen, die über einen Carbonylrest an das Grundgerüst gebunden sind. Bevorzugt sind Pyridin, Imidazol, Pyrimidin, Purin, Pyrazin oder Chinolin.

30 Als Substituenten der genannten Reste von R<sup>4</sup> kommen beispielsweise ein oder mehrere Substituenten wie Halogen wie Fluor, Chlor oder Brom, Thio, Nitro, Amino, Hydroxy, Alkyl, Alkoxy, Alkenyl, Alkenyloxy, Alkinyl oder weitere aromatischen oder weitere gesättigte oder ungesättigte nicht aromatische Ringen oder Ringsystemen in Frage. Bevorzugt sind Alkylreste wie C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl wie Methyl, Ethyl, Propyl oder Butyl, Halogen wie Chlor, Fluor oder Brom, Hydroxy oder Amino.

35 Bevorzugt ist für den Rest R<sup>4</sup> Wasserstoff.

40 R<sup>5</sup> bezeichnet im Rest NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup> Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkyl-, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-Alkenyl-, Aryl- oder Hetaryl-, wobei die Alkyl-, Alkenyl-, Aryl- und Hetarylreste die oben genannte

# DE 198 48 129 A 1

Bedeutung haben. Bevorzugt ist Wasserstoff oder C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkyl- wie Methyl, Ethyl oder Propyl.

Als Substituenten der genannten Reste von R<sup>5</sup> kommen beispielsweise ein oder mehrere Substituenten wie Halogen wie Fluor, Chlor oder Brom, Thio, Nitro, Amino, Hydroxy, Alkyl, Alkoxy, Alkenyl, Alkenyloxy, Alkinyl oder weitere aromatischen oder weitere gesättigte oder ungesättigte nicht aromatische Ringen oder Ringsystemen in Frage. Bevorzugt sind Alkylreste wie C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl wie Methyl, Ethyl, Propyl oder Butyl, Aryl wie Phenyl, Halogen wie Chlor, Fluor oder Brom, Hydroxy oder Amino.

Weiter können zwei benachbarte Substituenten R<sup>4</sup> oder R<sup>5</sup> zusammen einen weiteren substituierten oder unsubstituierten aromatischen, gesättigten oder teilweise gesättigten Ring mit 5 bis 6 Atomen im Ring bilden, der ein oder mehrere Heteroatome wie O, N oder S enthalten kann.

Vorteilhaft bedeutet einer der Substituenten R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> oder R<sup>3</sup> in den Formeln I und II Aryl wie Phenyl. Weiterhin bedeutet einer der Substituenten R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> oder R<sup>3</sup> in den Formeln I und II bevorzugt Hydroxy und einer Wasserstoff oder Methyl.

Das erfundungsgemäße Verfahren wird vorteilhaft bei einem pH-Wert von 4 bis 11, bevorzugt von 4 bis 9 durchgeführt.

Weiterhin werden im Verfahren vorteilhaft von 0,01 bis 10 Gew.-% Nitrit oder 0,01 bis 10 Gew.-% eines entsprechenden Aldehyds oder Ketons und 0,01 bis 10 Gew.-% Blausäure verwendet. Vorteilhaft wird das Verfahren mit einem Überschuss an Blausäure durchgeführt. Dies führt unter Umständen zu höheren als den angegebenen Blausäureanteilen. Je nach Nitrit können unterschiedliche Mengen an Nitrit in der Reaktion verwendet werden. Die geringsten Mengen an Nitrit werden vorteilhaft bei Nitriten (Cyanhydrine) verwendet (= Mengen zwischen 0,01 bis 5 Gew.-%), die im Gleichgewicht mit den entsprechenden Aldehyden und Blausäure stehen. Da der Aldehyd für die Mikroorganismen oder Enzyme in der Regel toxisch ist. Nitrite, die leicht flüchtig sind, werden ebenfalls vorteilhaft in Mengen zwischen 0,01 bis 5 Gew.-% eingesetzt. Bei höheren Cyanhydrin- bzw. Nitritmengen läuft die Reaktion verzögert ab. Bei Nitriten, die nur geringe oder nahezu keine Lösungsmittelleigenschaften haben oder Nitriten, die sich nur in sehr geringen Mengen in wässrigen Medium lösen, können vorteilhaft auch größere als die oben angegebenen Mengen eingesetzt werden. Zur Erhöhung des Umsatzes und der Ausbeute wird die Reaktion vorteilhafterweise unter kontinuierlicher Zugabe des racemischen Nitrits durchgeführt. Das Produkt kann nach Ende der Reaktion isoliert werden oder aber in einem Bypass kontinuierlich entfernt werden.

Unter den oben genannten, entsprechenden Aldehyden oder Ketonen sind Verbindungen zu verstehen, die nach Reaktion zwischen dem Aldehyd oder Keton und Blausäure ggf. unter Säurekatalyse das Nitrit bilden. Die Reaktion zwischen Aldehyd und Blausäure führt zu Cyanhydrinen, die den Vorteil haben, daß sie mit Aldehyd und Blausäure im Gleichgewicht liegen. Durch die Gleichgewichtseinstellung des Cyanhydrins ist es möglich mit einem Enzym, das nur ein Enantiomer des Nitrits umsetzt, trotzdem zu 100% Ausbeute in der Theorie zu kommen, da das racemische Nitrit ständig nachgeliefert wird. Bei allen anderen Nitriten wird das enzymatisch nicht umgesetzte Nitrit (= "falsches" bzw. anderes Enantiomer) vorteilhaft über eine chemische Reaktion racemisiert und dem Verfahren wieder zugeführt, um eine theoretische Ausbeute von 100% erreichen zu können, verworfen oder aufgereinigt und chemisch unter Erhalt des Stereoenzymes verseift.

Das erfundungsgemäße Verfahren wird vorteilhaft bei einer Temperatur zwischen 0°C bis 80°C, bevorzugt zwischen 10°C bis 60°C, besonders bevorzugt zwischen 15°C bis 50°C durchgeführt.

Unter racemischen Nitriten im erfundungsgemäßen Verfahren sind Nitrite zu verstehen, die aus einem 50 : 50 Gemisch der beiden Enantiomere oder aus einem beliebigen anderen Gemisch mit einer Anreicherung eines der beiden Enantiomere im Gemisch bestehen.

Unter chiralen Carbonsäuren sind im erfundungsgemäßen Verfahren zu verstehen, die eine Enantiomerenanreicherung zeigen. Bevorzugt werden im Verfahren Enantiomerenreinheiten von mindestens 90%ee, bevorzugt von min. 95%ee, besonders bevorzugt von min. 98%ee, ganz besonders bevorzugt min. 99%ee erreicht.

Das erfundungsgemäße Verfahren ermöglicht die Umsetzung einer großen Vielzahl von racemischen Nitriten zu den chiralen Carbonsäuren. Im Verfahren lassen sich mindestens 25 mmol Nitrit/h × mg Protein oder mindestens 25 mmol Nitrit/h × g Trockengewicht der Mikroorganismen umsetzen, bevorzugt mindestens 30 mmol Nitrit/h × mg Protein oder mindestens 30 mmol Nitrit/h × g Trockengewicht, besonders bevorzugt mindestens 40 mmol Nitrit/h × mg Protein oder mindestens 40 mmol Nitrit/h × g Trockengewicht, ganz besonders bevorzugt mindestens 50 mmol Nitrit/h × mg Protein oder mindestens 50 mmol Nitrit/h × g Trockengewicht.

Für das erfundungsgemäße Verfahren können wachsende Zellen verwendet werden, die die erfundungsgemäßen Nukleinsäuren, Nukleinsäurestrukture oder Vektoren enthalten. Auch ruhende oder aufgeschlossene Zellen können verwendet werden. Unter aufgeschlossenen Zellen sind beispielsweise Zellen zu verstehen, die über eine Behandlung mit beispielsweise Lösungsmitteln durchlässig gemacht worden sind, oder Zellen die über eine Enzymbehandlung, über eine mechanische Behandlung (z. B. French Press oder Ultraschall) oder über eine sonstige Methode aufgebrochen wurden. Die so erhaltenen Rohextrakte sind für das erfundungsgemäße Verfahren vorteilhaft geeignet. Auch gereinigte oder ange reinigte Enzyme können für das Verfahren verwendet werden. Ebenfalls geeignet sind immobilisierte Mikroorganismen oder Enzyme, die vorteilhaft in der Reaktion Anwendung finden können.

Die im erfundungsgemäßen Verfahren hergestellten chiralen Carbonsäuren lassen sich vorteilhaft aus der wässrigen Reaktionslösung über Extraktion oder Kristallisation oder über Extraktion und Kristallisation gewinnen. Hierzu wird die wässrige Reaktionslösung mit einer Säure wie einer Mineralsäure (z. B. HCl oder H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) oder einer organischen Säure angesäuert vorteilhaft auf pH-Werte unter 2 und anschließend mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert. Die Extraktion kann zur Erhöhung der Ausbeute mehrfach wiederholt werden. Als organische Lösungsmittel können prinzipiell alle Lösungsmittel verwendet werden, die mit Wasser gegebenenfalls nach Zugabe von Salzen eine Phasengrenze zeigen. Vorteilhafte Lösungsmittel sind Lösungsmittel wie Toluol, Benzol, Hexan, Methyltertiärbutylether oder Essigester.

Nach Einengen der organischen Phase können die Produkte in der Regel in guten chemischen Reinheiten, das heißt größer 90% chemische Reinheit, gewonnen werden. Nach Extraktion kann die organische Phase mit dem Produkt aber auch nur zum Teil eingeeengt werden und das Produkt auskristallisiert werden. Dazu wird die Lösung vorteilhaft auf eine Temperatur von 0°C bis 10°C abgekühlt. Die Kristallisation kann auch direkt aus der organischen Lösung erfolgen. Das auskristallisierte Produkt kann nochmals in im gleichen oder in einem anderen Lösungsmittel zur erneuten Kristallisation

# DE 198 48 129 A 1

aufgenommen werden und nochmals kristallisiert werden. Durch die anschließende mindestens einmalige Kristallisation kann die Enantiomerenreinheit des Produktes je nach Lage des Eutektikum weiter gesteigert werden.

Die chiralen Carbonsäuren können jedoch auch direkt nach Ansäuern mit einer Säure auf einen pH-Wert vorteilhaft unter 2 aus der wäßrigen Reaktionslösung auskristallisiert werden. Vorteilhaft wird dazu die wäßrige Lösung unter Erwärmung eingengt und in ihrem Volumen um 10 bis 90%, bevorzugt 20 bis 80%, besonders bevorzugt 30 bis 70% reduziert. Vorzugsweise wird die Kristallisation unter Kühlung durchgeführt. Temperaturen zwischen 0°C bis 10°C sind für die Kristallisation bevorzugt. Aus Kostengründen ist die direkte Kristallisation aus der wäßrigen Lösung bevorzugt. Ebenfalls bevorzugt wird eine Aufarbeitung der chiralen Carbonsäuren über ein Extraktion und gegebenenfalls anschließender Kristallisation.

Bei diesen bevorzugten Aufarbeitungsarten läßt sich das Produkt des erfundungsgemäßen Verfahrens in Ausbeuten von 60 bis 100%, bevorzugt von 80 bis 100%, besonders bevorzugt von 90 bis 100% bezogen auf das für die Reaktion eingesetzte Nitril isolieren. Das isoliert Produkt zeichnet sich durch eine hohe chemische Reinheit von > 90%, bevorzugt > 95% besonders bevorzugt von > 98% aus. Weiterhin haben die Produkt eine hohe Enantiomerenreinheit, die durch die Kristallisation weiter gesteigert werden kann.

Die so gewonnenen Produkte eignen sich als Ausgangsmaterial für organischen Synthesen zur Herstellung von Pharmaka oder Agrochemikalien oder zur Racematspaltung.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine isolierte Nukleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid mit Nitrilaseaktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe:

- 20 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz ableiten,
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 95% Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne daß die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich reduziert ist.

Unter Homologe der erfundungsgemäßen Nukleinsäuresequenz mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 sind beispielsweise Allelvarianten zu verstehen, die mindestens 95% Homologie auf der abgeleiteten Aminosäureebene, bevorzugt mindestens 97% Homologie, ganz besonders bevorzugt mindestens 98% Homologie über den gesamten Sequenzbereich aufweisen. Über Teilebereiche der Sequenzen können die Homologien vorteilhaft höher liegen. Die von SEQ ID NO: 1 abgeleitete Aminosäuresequenz ist SEQ ID NO: 2 zu entnehmen. Allelvarianten umfassen insbesondere funktionelle Varianten, die durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz erhältlich sind, wobei die enzymatische Aktivität der abgeleiteten synthetisierten Proteine für das Einbringen eines oder mehrerer Gene in einen Organismus jedoch erhalten nicht wesentlich reduziert sein sollte. Die Erfindung betrifft damit auch Aminosäuresequenzen, die durch die oben dargestellte Gruppe von Nukleinsäuresequenzen kodiert werden. Vorteilhaft betrifft die Erfindung Aminosäuresequenzen, die durch die Sequenz SEQ ID NO: 1 kodiert werden.

Weiterhin sind unter Homologe der SEQ ID NO: 1 beispielsweise pilzliche oder bakterielle Homologe, verkürzte Sequenzen, Einzelstrang-DNA oder RNA der codierenden und nichtcodierenden DNA-Sequenz zu verstehen. Homologe der SEQ ID NO: 1 besitzen auf DNA-Ebene eine Homologie von mindestens 60%, bevorzugt von mindestens 70%, besonders bevorzugt von mindestens 80%, ganz besonders bevorzugt von mindestens 90% über den gesamten in SEQ ID NO: 1 angegebenen DNA-Bereich.

Außerdem sind unter Homologe der SEQ ID NO: 1 Derivate wie beispielsweise Promotorvarianten zu verstehen. Die Promotoren, die den angegebenen Nukleotidsequenzen vorgeschalten sind, können durch ein oder mehrere Nukleotidaustausche, durch Insertion(en) und/oder Deletion(en) verändert sein, ohne daß aber die Funktionalität bzw. Wirksamkeit der Promotoren beeinträchtigt sind. Des Weiteren können die Promotoren durch Veränderung ihrer Sequenz in ihrer Wirksamkeit erhöht oder komplett durch wirksamere Promotoren auch artfremder Organismen ausgetauscht werden.

Unter Derivaten sind auch Varianten zu verstehen, deren Nukleotidsequenz im Bereich von -1 bis -200 vor dem Startkodon oder 0 bis 1000 Basenpaare nach dem Stopkodon so verändert wurden, daß die Genexpression und/oder die Proteinexpression verändert, bevorzugt erhöht wird.

Vorteilhaft läßt sich die SEQ ID NO: 1 oder seine Homologen aus Bakterien, bevorzugt aus gram-negativen Bakterien, besonders bevorzugt aus Bakterien der Gattung Alcaligenes, ganz besonders bevorzugt aus Bakterien der Gattung und Art Alcaligenes faecalis über dem Fachmann bekannte Methoden isolieren.

SEQ ID No: 1 oder seine Homologen oder Teile dieser Sequenzen lassen sich beispielsweise mit üblichen Hybridisierungsverfahren oder der PCR-Technik aus anderen Pilzen oder Bakterien isolieren. Diese DNA-Sequenzen hybridisieren unter Standardbedingungen mit den erfundungsgemäßen Sequenzen. Zur Hybridisierung werden vorteilhaft kurze Oligonukleotide der konservierten Bereiche beispielsweise aus dem aktiven Zentrum, die über Vergleiche mit anderen Nitralasen oder Nitrilhydratasen in dem Fachmann bekannter Weise ermittelt werden können, verwendet. Es können aber auch längere Fragmente der erfundungsgemäßen Nukleinsäuren oder die vollständigen Sequenzen für die Hybridisierung verwendet werden. Je nach der verwendeten Nukleinsäure Oligonukleotid, längeres Fragment oder vollständige Sequenz oder je nachdem welche Nukleinsäureart DNA oder RNA für die Hybridisierung verwendet werden, variieren diese Standardbedingungen. So liegen beispielsweise die Schmelztemperaturen für DNA : DNA-Hybride ca 10°C niedriger als die von DNA : RNA-Hybridien gleicher Länge.

Unter Standardbedingungen sind beispielsweise je nach Nukleinsäure Temperatur zwischen 42 und 58°C in einer wäßrigen Pufferlösung mit einer Konzentration zwischen 0,1 bis 5 × SSC (1 × SSC = 0,15 M NaCl, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,2) oder zusätzlich in Gegenwart von 50% Formamid wie beispielsweise 42°C in 5 × SSC, 50% Formamid zu verstehen. Vorteilhafterweise liegen die Hybridisierungsbedingungen für DNA : DNA-Hybride bei 0,1 × SSC und Temperaturen zwischen etwa 20°C bis 45°C, bevorzugt zwischen etwa 30°C bis 45°C. Für DNA : RNA-Hybride liegen die Hybridisierungsbedingungen vorteilhaft bei 0,1 × SSC und Temperaturen zwischen etwa 30°C bis 55°C, bevorzugt zwi-

# DE 198 48 129 A 1

schen etwa 45°C bis 55°C. Diese angegebenen Temperaturen für die Hybridisierung sind beispielhaft kalkulierte Schmelztemperaturwerte für eine Nukleinsäure mit einer Länge von ca. 100 Nukleotiden und einem G + C-Gehalt von 50% in Abwesenheit von Formamid. Die experimentellen Bedingungen für die DNA-Hybridisierung sind in einschlägigen Lehrbüchern der Genetik wie beispielsweise Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, beschrieben und lassen sich nach dem Fachmann bekannten Formeln beispielsweise abhängig von der Länge der Nukleinsäuren, der Art der Hybride oder dem G + C-Gehalt berechnen. Weitere Informationen zur Hybridisierung kann der Fachmann folgenden Lehrbüchern entnehmen: Ausubel et al. (eds), 1985, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York; Haines and Higgins (eds), 1985, Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (ed), 1991, Essential Molecular Biology: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

Unter dem erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukt sind die Nitrilasegen Sequenz SEQ ID No. 1 und seine Homologen zu verstehen, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen vorteilhafterweise zur Erhöhung der Genexpression funktionell verknüpft wurden. Beispielsweise handelt es sich bei diesen regulatorischen Sequenzen um Sequenzen an die Induktoren oder Repressoren binden und so die Expression der Nukleinsäure regulieren. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so daß die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wurde. Das Nukleinsäurekonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es wurden keine zusätzlichen Regulationssignale vor die Sequenz SEQ ID No. 1 oder seine Homologen inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wurde nicht entfernt. Stattdessen wird die natürliche Regulationssequenz so mutiert, daß keine Regulation mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert wird. Das Nukleinsäurekonstrukt kann außerdem vorteilhafterweise auch eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promotor enthalten, die eine erhöhte Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der DNA-Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können in einer oder mehreren Kopien im Konstrukt enthalten sein. Im Konstrukt können noch weitere Marker wie Antibiotikaresistenzen oder Auxotrophien komplementierende Gene gegebenenfalls zur Selektion auf das Konstrukt enthalten sein.

Vorteilhafte Regulationssequenzen für das erfindungsgemäße Verfahren sind beispielsweise in Promotoren wie cos-tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lacI<sup>r</sup>, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, λ-P<sub>R</sub>- oder im λ-P<sub>L</sub>-Promotor enthalten, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden. Weitere vorteilhafte Regulationssequenzen sind beispielsweise in den gram-positiven Promotoren amy und SPO2, in den Hefe- oder Pilzpromotoren ADC1, MFα, AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEF, rp28, ADH. In diesem Zusammenhang sind auch die Promotoren der Pyruvatdecarboxylase und der Methanoloxidase aus beispielsweise Hansenula vorteilhaft. Es können auch künstliche Promotoren für die Regulation verwendet werden.

Das Nukleinsäurekonstrukt wird zur Expression in einem Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen Vektor wie beispielsweise einem Plasmid, einem Phagen oder sonstiger DNA inseriert, das eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Diese Vektoren stellen eine weitere Ausgestaltung der Erfindung dar. Geeignete Plasmide sind beispielsweise in E. coli pLG338, pA-CYC184, pBR322, pUC18, pUC19, pKC30, pRep4, pHs1, pHs2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III<sup>13</sup>-B1, λgt11 oder pBdCI, in Streptomyces pJ101, pJ364, pJ702 oder pJ361, in Bacillus pUB110, pC194 oder pBD214, in Corynebacterium pSA77 oder pAJ667, in Pilzen pALS1, pIL2 oder pBB116, in Hefen 2 μM, pAG-1, YEpl6, YEpl3 oder pEMBLYe23 oder in Pflanzen pLGV23, pGHlac<sup>r</sup>, pBIN19, pAK2004 oder pDH51. Die genannten Plasmide stellen eine kleine Auswahl der möglichen Plasmide dar. Weitere Plasmide sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus dem Buch Cloning Vectors (Eds. Pouwels P. H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018) entnommen werden.

Vorteilhafterweise enthält das Nukleinsäurekonstrukt zur Expression der weiteren enthaltenen Gene zusätzlich noch 3' und/oder 5' terminale regulatorische Sequenzen zur Steigerung der Expression, die je nach ausgewähltem Wirtsorganismus und Gen oder Gene für eine optimale Expression ausgewählt werden.

Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Gene und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, daß das Gen erst nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder daß es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Genexpression der eingeführten Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

In einer weiteren Ausgestaltungsform des Vektors kann der das erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukt oder die erfindungsgemäße Nukleinsäure enthaltende Vektor auch vorteilhafterweise in Form einer linearen DNA in die Mikroorganismen eingeführt werden und über heterologe oder homologe Rekombination in das Genom des Wirtsorganismus integriert werden. Diese lineare DNA kann aus einem linearisierten Vektor wie einem Plasmid oder nur aus dem Nukleinsäurekonstrukt oder der Nukleinsäure bestehen.

Für eine optimale Expression heterologer Gene in Organismen ist es vorteilhaft die Nukleinsäuresequenzen entsprechend des im Organismus verwendeten spezifischen "codon usage" zu verändern. Der "codon usage" läßt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene des betreffenden Organismus leicht ermitteln.

Als Wirtsorganismen für die erfindungsgemäße Nukleinsäure oder dem Nukleinsäurekonstrukt kommen prinzipiell alle prokaryontischen oder eukaryontischen Organismen in Frage. Vorteilhafterweise werden als Wirtsorganismen Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze oder Hefen verwendet. Vorteilhaft werden grampositive oder gram-negative Bakterien, bevorzugt Bakterien der Familie Enterobacteriaceae oder Nocardiaceae, besonders bevorzugt Bakterien der Gattungen Escherichia, Pseudomonas oder Rhodococcus verwendet. Ganz besonders bevorzugt ist die Gattung und Art Escherichia coli.

# DE 198 48 129 A 1

Der Wirtsorganismus gemäß der Erfindung enthält dabei vorzugsweise mindestens ein proteinisches Agenz zur Fallung der von ihm synthetisierten Polypeptide und insbesondere der in dieser Erfindung beschriebenen Nukleinsäuresequenzen mit Nitrilaseaktivität und/oder die dieses Agenz codierenden Gene, wobei dieses Agenz in einer Menge vorliegt, die größer ist als die, die der Grundmenge des betrachteten Mikroorganismus entspricht. Die für dieses Agenz codierenden Gene sind im Chromosom oder in extrachromosomalen Elementen wie zum Beispiel Plasmiden enthalten.

## Beispiele

### Beispiel 1

10

#### Reinigung der Nitrilase aus *Alcaligenes faecalis* 1650

##### 1. Herstellung der Zellen

15 *Alcaligenes faecalis* 1650 wurde bei 30°C für die Dauer von 8 Stunden in Kulturmedium A unter Schütteln kultiviert.

##### Kulturmedium A

Hefextrakt	5 g/l
Pepton	3,5 g/l
CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> NH <sub>4</sub>	5 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 g/l
MgSO <sub>4</sub>	0,2 g/l
FeSO <sub>4</sub>	0,03 g/l
25 NaCl	1 g/l
Butyronitril	1 g/l

20 Mit 200 ml dieser Vorkultur wurde ein 101-Fermenter mit 81 frischem Medium A beimpft. Der pH, die Temperatur, der Luftstrom und die Rührgeschwindigkeit lagen bei 7,2; 30°C, 300 l/h und 300 upm. Nach 22 Std. wurden 81 g Naßzellmasse gewonnen. Das entspricht einem Zelltrockengewicht von 3,8 g/l und einer optischen Dichte bei 600 nm von 8.

##### 2. Bestimmung der enzymatischen Aktivität gegenüber Mandelonitrit

25 Die Zellen wurden wie in Beispiel 1 beschrieben gewonnen und in 10 mM Na/K-Phosphatpuffer, pH 7,2 zweimal gewaschen. 40 mg Zelltrockengewicht wurden in 20 ml 10 mM Na/K-Phosphatpuffer, pH 6,8, resuspendiert und die Reaktion durch Zugabe von 8,3 mM Mandelonitrit gestartet. Die Reaktion wurde unter Schütteln bei 40°C durchgeführt. Die Kinetik der Racematspaltung wurde durch Probenentnahme und anschließender Zellabtrennung mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (ODS Hypersil) verfolgt. Dabei wurde Mandelonitrit, Benzaldehyd, Mandelsäureamid und Mandelsäure bestimmt. Die Ergebnisse sind in Fig. 1 [Umsetzung von Mandelonitrit (= Mandelsäurenitrit) zu Mandelsäure, Batch] dargestellt. Die Bildungsgeschwindigkeit von Mandelsäure beträgt 41,3 U/g Zelltrockengewicht bei einem Umsatz von 30%, wobei 1 U definiert ist als 1 µmol Mandelsäure, das pro Minute bei 40°C gebildet wird.

##### 3. Bestimmung der enzymatischen Selektivität gegenüber Mandelonitrit

35 Die Zellen wurden wie in Beispiel 1 beschrieben gewonnen und in 10 mM Na/K-Phosphatpuffer, pH 7,2 zweimal gewaschen. 40 mg Zelltrockengewicht wurden in 20 ml 10 mM Na/K-Phosphatpuffer, pH 6,8, resuspendiert und die Reaktion durch Zugabe von 8,3 mM Mandelonitrit gestartet. Die Reaktion wurde unter Schütteln bei 30°C durchgeführt. Die Kinetik wurde durch Probenentnahme und anschließende Zellabtrennung mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (Nucleodex β-PM) verfolgt. Dabei wurde S-(+)- und R(-)-Mandelsäure bestimmt. Die optische Reinheit der gebildeten R(-)-Mandelsäure (ee<sub>R</sub>-MS) betrug 98% bei 50% Umsatz. Die Selektivität des Enzyms (= E) lag bei 50% Umsatz bei 499.

##### 4. Reinigung

45

In allen Puffern war während der Reinigung – falls nicht anders angegeben – 10 mM DTT anwesend.

##### Schritt 1

50

##### Zellaufschluß

55 Die Zellen aus je zwei 101-Fermentationen wurden wie in Beispiel 1 beschrieben gewonnen, abzentrifugiert und zweimal mit 1 l 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,2 gewaschen. Die Ausbeute betrug ca. 162 g Zellfeuchtmasse. Je 81 g Zellfeuchtmasse wurden in 160 ml 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,2, resuspendiert und viermal in einem Manton-Gaulin bei 750 bar aufgeschlossen. Das Homogenat wurde dann für 30 min bei 30.000 g zentrifugiert und das Pellet verworfen. Der Überstand (140 ml) hatte eine Restaktivität von 73% wie in Tab. 1 dargestellt.

# DE 198 48 129 A 1

## Schritt 2

### Ionenaustauschchromatographie

Der Überstand wurde mit Puffer A (20 mM Tris/HCl, pH 8,5) auf 400 ml verdünnt und nochmals bei 23000 g für 20 min zentrifugiert. 350 ml wurden dann auf eine Q-Sepharose Säule (Durchmesser 5 cm, Höhe 22 cm, Volumen 432 ml, Q-Sepharose Fast Flow von Pharmacia) in Puffer A aufgetragen. Bei einem Fluß von 20 ml/min wurde zunächst mit 10% Puffer B (wie Puffer A mit 1 M NaCl) gewaschen (gesamtes Aufrags- und Waschvolumen entsprach 1,5 l). Im Verlauf von 90 min wurde linear das Verhältnis bis zu 60% B gesteigert. Von 91 bis 120 min wurde dann mit 100% Puffer B gewaschen. Es wurden 100 40 ml-Fraktionen gesammelt. Die Nitrilase eluierte zwischen den Fraktionen 50 und 60. Die Fraktionen wurden vereinigt und durch Ultrafiltration über eine 10 kDa Membran (Amicon) auf ein Volumen von 10 ml aufkonzentriert.

5

10

15

## Schritt 3

### Molekularsiebchromatographie

Das Konzentrat aus der Ionenaustauschchromatographie (Schritt 2) wurde in zwei Portionen zu je 5 ml durch Molekularsiebchromatographie (Superdex 200 prep. grade, Pharmacia, Trennbereich 10 bis 600 kDa, 2,6 cm Durchmesser, 60 cm Höhe, 325 ml Volumen) weiter gereinigt. Die Detektion erfolgte bei 280 nm. Die Säule war in 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,4, 5 mM DTT und 150 mM NaCl äquilibriert und wurde mit einem Fluß von 1,5 ml/min betrieben. Es wurden 40 Fraktionen gesammelt. Die Nitril-verseifende Aktivität befand sich in den Fraktionen 3 bis 5.

20

25

## Schritt 4

### Ionenaustauschchromatographie

Die vereinigten Fraktionen aus der Molekularsiebchromatographie (Schritt 3) wurden durch Ionenaustauschchromatographie über eine Mono Q Säule (Säulenvolumen 1 ml, Mono Q HR515, Pharmacia) weiter gereinigt. Als Puffer A diente 20 mM Tris/HCl, pH 8,5, 5 mM DTT, als Puffer B der gleiche Puffer wie in A mit 1 M NaCl. Die Flußgeschwindigkeit betrug 1 ml/min. Die auf eine Leitfähigkeit von ca. 6 mS/cm verdünnte Wertfraktion aus der Molekularsiebchromatographie (ca. 100 ml) wurde direkt auf die Mono Q Säule gegeben und das Protein so adsorbiert. Die Säule wurde nach dem Auftrag mit 5% Puffer B gewaschen. Die Säule wurde in 30 min mit einem Gradienten von 5% bis 40% B eluiert, gefolgt von 100% B für 10 Minuten. Die Elution der Nitrilase erfolgte in Fraktion 17 und 18 des Gradienten.

30

Die Schritte 1–4 der Reinigung werden in Tabelle I wiedergegeben.

35

Tabelle I

#### Reinigungsschema

Probe	Vol. [ml]	Aktivität [U/l]	Gesamt-aktivität [mU]	Ausbeute [%]	Protein [mg/ml]	Gesamtprotein [mg]	Spez. Aktivität [U/g]
vor Aufschluß	160	480	76800	100	-	-	-
nach Aufschluß	140	400	56000	72,9	-	-	-
<b>Q-Sepharose</b>							
Auftrag	140	192	26880	35	12,4	1736	15
WF	400	77	30800	40,1	0,26	104	296
<b>Superdex 200</b>							
Auftrag	9,5	>378	>3591	4,7	2,41	22,90	>157
WF	43	59	2537	3,3	0,21	9,03	281
<b>MonoQ</b>							
Auftrag	100	4,8	480	0,6	0,06	6,33	76
WF	4	>77	308	0,4	0,19	0,76	>405

40

45

50

55

60

65

# DE 198 48 129 A 1

Die Wertfraktionen (= WF, Tabelle I) der Molekularsiebohromatographie (Schritt 3) und Ionenaustauschchromatographie über Mono Q (Schritt 4) sind über SDS-PAGE aufgetrennt worden wie in Fig. 2 dargestellt.

## Schritt 5

### Reversed-Phase (RP)-Hochflüssigkeitschromatographie

Die Wertfraktion (Fraktion 17 und 18) der Mono Q Chromatographie (Schritt 4) wurde durch RP-Chromatographie auf Homogenität überprüft und zur Vorbereitung einer Trypsinspaltung weiter gereinigt. Zur Trennung wurde eine Säule (3 cm) von Abimed an einem Hewlett-Packard Gerät (HP 1090) eingesetzt. Als Laufmittel diente Puffer A: Wasser mit 0,1% TFA und Puffer B: Acetonitril mit 0,1% TFA. Injektionsvolumen 0,1 ml, Flussgeschwindigkeit 0,5 ml/min. Der Elutionsgradient hatte folgenden Verlauf:

Minute	% Puffer A	% Puffer B
0	80	20
2	80	20
22	30	70
22,1	0	100
24	0	100
25	100	0
30	100	0

Die Nitrilase eluierte zwischen 12 und 13 Minuten. Im SDS-PAGE entspricht das einer 37 kDa-Bande. Diese Bande wurde ansequenziert. Es wurde der Sequenzer "494 Procise Protein Sequenzer" der Firma Applied Biosystems verwendet. Die so erhaltene N-terminale Sequenz von 39 Aminosäuren wird im Folgenden mit SEQ ID NO: 3 bezeichnet. Die Sequenz ist in der beigefügten Liste der Sequenzen aufgeführt und lautet: Met Gln Thr Arg Lys Ile Val Arg Ala Ala Ala Val Gln Ala Ala Ser Pro Asn Tyr Asp Leu Ala Thr Gly Val Asp Lys Thr Ile Glu Leu Ala Arg Gln Ala Arg Asp Glu Gly.

### Herstellung tryptischer Peptide

Die Probe aus der Mono Q Chromatographie (Schritt 4) wurde wie folgt vorbehandelt: das Protein (ca. 0,6 mg) wurde durch 12,5% TCA gefällt und das Pellet dreimal mit 1 ml Ether/Ethanol (1 : 1) gewaschen. Das Pellet wurde in 0,2 ml 6 M Guanidin HCl, 25 mM Tris/HCl, pH 8,5 gelöst. Zu dieser Lösung wurden 2,6 µl einer 1 M DTT-Lösung zur Reduktion der Disulfitbrücken gegeben. Die Probe wurde eine Stunde in Dunkelheit geschüttelt. Danach wurde das Protein mit 1,5 µl einer 4-Vinylpyridinlösung (35%) für 2 Stunden in Dunkelheit umgesetzt. Die Reaktion wurde durch Inkubation für 1 Stunde mit 2,6 µl einer 1 M DTT-Lösung beendet. Das vinylpyrilierte Enzym wurde wie oben beschrieben durch RP-HPLC gereinigt. Die Retentionszeit betrug nun zwischen 10 und 11 Minuten. Die Wertfraktion, identifiziert durch ihr Molekulargewicht, wurde gesammelt und auf 0,02 ml aufkonzentriert. Dazu wurden 0,01 ml Acetonitril und 0,1 M Tris/HCl, pH 8,5 ad 0,2 ml gegeben. Zur Korrektur des pH-Wertes wurden noch ca. 0,05 ml 0,1 M NaOH zugesetzt. Die Probe (0,3 mg geschätzte Proteinmenge) wurde mit 0,032 ml einer 1 mg/ml Trypsinlösung in 0,1 M Tris/HCl, pH 8,5, 5% Acetonitril, versetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Der Verdau wurde mit 0,01 ml Essigsäure gestoppt und dann zentrifugiert. Der Überstand wurde durch RP-HPLC auf C18 getrennt. (Laufsystem: Puffer A: Wasser, 0,1% TFA, Puffer B: Acetonitril, 0,1% TFA). Peptide (Detektion 205 nm und 280 nm) wurden gesammelt und sequenziert. Es wurde der Sequenzer "494 Procise Protein Sequenzer" der Firma Applied Biosystems verwendet. Die interne Peptidsequenz von 21 Aminosäuren wird im folgenden mit SEQ ID NO: 4, die interne Peptidsequenz von 11 Aminosäuren mit SEQ ID NO: 5 bezeichnet. SEQ ID NO: 4 und 5 sind in der beigefügten Liste der Sequenzen aufgeführt und lauten:  
SEQ ID NO: 4  
Glu Glu Ala Pro Glu Gln Gly Val Gln Ser Lys Ile Ala Ser Val Ala Ile Ser His Pro Gln  
SEQ ID NO: 5  
Glu Glu Ala Pro Glu Gln Gly Val Gln Ser Lys

### 6. Aktivität der gereinigten Nitrilase gegenüber Mandelonitril

Die Aktivität der gereinigten Nitrilase gegenüber Mandelonitril wurde wie in Beispiel 2 beschrieben untersucht. Die spezifische Aktivität des gereinigten Proteins gegenüber Mandelonitril lag bei 12.380 U/g Protein.

### Beispiel 2

#### Klonierung der Nitrilase aus Alcaligenes faecalis 1650

Aus den in Beispiel 1 dargestellten Peptidsequenzen SEQ ID NO: 3 und 4 wurden Nukleotidsonden abgeleitet und synthetisiert. Von der SEQ ID NO: 3, der N-terminalen Peptidsequenz, war die abgeleitete Nukleotidsonde ein 23 mer, 64 mal degeneriert (in der Sequenz der Nukleotidsonde wird A, C, G oder T durch N ersetzt; A oder G durch R; C oder G

# DE 198 48 129 A 1

durch 5). Durch den hohen Prozentanteil an GC der in der Literatur beschriebenen Stämme Alcaligenes (Wada et al., 1992, Nucl. Acids Res., 20, 2111–2118) waren im Falle des Glutamins und des Isoleucins die Auswahl der dritten Position des Codons vorgegeben. Die Nukleotidsonde, die im Folgenden mit SEQ ID NO: 6 bezeichnet wird, stellt den 5'-Primer für die nachfolgende PCR dar, wobei S = C oder G und N = A, C, G oder T bedeutet, und lautet:

SEQ ID NO: 6

5

5'-ATGCAGACNAGNAARATCGTSCG-3'

Von SEQ ID NO: 4, der internen Peptidsequenz, wurde ein 20 mer als Nukleotidsonde abgeleitet, 256 mal degeneriert (in der Sequenz der Nukleotidbasen wird A, C, G oder T durch N ersetzt; A oder G durch R; C oder G durch S). Durch den hohen Prozentanteil an GC der Stämme Alcaligenes war im Falle des Lysins die Auswahl der dritten Position des Codons vorgegeben. Diese Nukleotidsonde stellt den 3'-Primer für die nachfolgende PCR dar und wird im Folgenden mit SEQ ID NO: 7 bezeichnet. Sie ist in der beigelegten Liste der Sequenzen aufgeführt und lautet:

10

SEQ ID NO: 7

10

5'-TNGCSACNGANGCRATCTG-3'

15

Mit Hilfe dieses Primerpaars, SEQ ID NO: 6 und 7, wurde die PCR an chromosomaler DNA aus Alcaligenes faecalis 1650 durchgeführt. Die Isolierung chromosomaler DNA erfolgte nach Zellyse mit Lysozym und Proteinase K-Behandlung nach der dem Fachmann bekannten klassischen Methode (Ausubel, F. M. et al. (1994) Current protocols in molecular biology, John Wiley and Sons).

Unter Verwendung der Pwo-Polymerase beinhaltete die PCR eine Denaturierung für 3 min bei 95°C; 35 Zyklen mit einer Denaturierung für 1 min bei 95°C, einer Primeranlagerung für 1 min 30 sec bei 58°C und einer Polymerisation für 1 min 30 sec bei 72°C; und einer Abschlußpolymerisation für 5 min bei 72°C.

20

Unter diesen Bedingungen wurde aus der chromosomal DNA aus Alcaligenes faecalis 1650 ein etwa 1 kb großes Fragment amplifiziert. Zur Klonierung des PCR-Produktes wurde an die bereits erwähnten Primer je eine XbaI-Restriktionsschnittstelle und zwei zusätzliche Nukleotide angefügt (5'-AATCTAGA bzw. 5'-ATTCTAGA) und die PCR-Reaktion unter den oben genannten Bedingungen wiederholt. Erneut wurde ein etwa 1 kb-großes Fragment amplifiziert, das nach Reinigung und XbaI-Verdau in analog verdauln pUC18 ligiert wurde. Nach Transformation von E. coli JM109 und Isolierung des resultierenden Plasmids wurde die DNA durch Sequenzierung und anschließenden genomischen Southern Blot verifiziert. Die molekularbiologischen und mikrobiologischen Methoden zur Isolierung des kompletten Nitritase-Gens (nit) erfolgten nach den dem Fachmann bekannten klassischen Methoden. Die komplett Nitritase-Sequenz ist in SEQ ID NO: 1 dargestellt.

25

30

## Beispiel 3

### Homologie mit anderen Proteinen, Identifizierung der homologen Sequenz

Der Vergleich mit Sequenzen aus der Proteindatenbank SWISSPROT zeigte, daß das Nitritasegen in dieser Erfindung 11 bis 96% Homologie zu bekannten Nitritasen auf Aminosäureebene besitzt. Die höchste Sequenzhomologie wurde zu der Arylacetonitrilspezifischen Nitritase aus Alcaligenes faecalis JM3 (Nagasaki et al., Eur. J. Biochem. 1990, 194, 765–772) gefunden. Die beiden Nitritasegene weisen eine Identität von 93,2% auf Nukleotidebene über einen Bereich von 1071 bp auf. Die abgeleitete Aminosäuresequenz weist eine Identität von 96,1% über einen Bereich von 356 Aminosäuren auf. Die geringste Homologie von 11,4% über einen Bereich von 534 Aminosäuren wurde zu der Nitritase aus Rhodococcus erythropolis SK92 (EP-A-0 719 862) gefunden.

35

40

## Beispiel 4

### Heterologe Expression der Nitritase in E. coli

45

Zur Klonierung in den Expressionsvektor pJOE2702 wurde das nit-Gen amplifiziert. Dabei wurde als 5'-Primer für die PCR die o. g. SEQ ID NO: 3 ausgewählt, wobei an das 5'-nit-Ende eine mit dem Translationsstart überlappende NdeI-Schnittstelle angefügt wurde. Dieser Primer wird im Folgenden als SEQ ID NO: 8 bezeichnet und ist in der beigelegten Liste der Sequenzen aufgeführt. Als 3'-Primer wurde ein 24 mer aus dem 3'-Bereich des nit-Gens ausgewählt, bei dem eine an das Stopcodon angrenzende BamHI-Schnittstellen angefügt wurde. Er wird im Folgenden als SEQ ID NO: 9 bezeichnet und ist in der nachfolgenden Liste der Sequenzen aufgeführt.

50

5'-TTAACATATGCAGACAAGAAAAATCGTCCG-3' (= SEQ ID NO: 8)

50

5'-AAGGAATCC'TCAAGACGGC'TCTTGCACTAGCAG-3' (= SEQ ID NO: 9)

55

Unter Verwendung der Pwo-Polymerase beinhaltete die PCR eine Denaturierung für 3 min bei 94°C; 25 Zyklen mit einer Denaturierung für 1 min bei 93°C, einer Primeranlagerung für 1 min 30 sec bei 55°C und einer Polymerisation für 1 min 30 sec bei 72°C bzw. einer Abschlußpolymerisation für 5 min bei 72°C. Das erhaltene PCR-Fragment wurde gereinigt, mit NdeI/BamHI verdaul und in analog verdauln Vektor pJOE2702 (Volffet al., 1996, Mol. Microbiol., 21(5), 1037–1047) integriert. Das resultierende Plasmid wurde mit pDHE 19.2 bezeichnet und ist in Fig. 3 dargestellt. Durch die Integration über die NdeI/BamHI-Schnittstellen steht das nit-Gen in dem Plasmid pDHE19.2 unter Transkriptionskontrolle des in pJOE2702 enthaltenen Promotores rhaP, der aus dem positiv regulierten L-Rhamnose-Operon rhaBAD in E. coli (Egan & Schleif, 1994, J. Mol. Biol., 243, 821–829) stammt. Die Transkriptionstermination des nit-Gens und die Translationsinitiation erfolgen ebenfalls über Vektorsequenzen. Daneben enthält das Plasmid noch ein Gen, das die Ampicillin-Resistenz ApR verleiht.

60

Die heterologe Expression der Nitritase wurde bei dem das Plasmid pDHE19.2 enthaltenden Stamm E. coli JM109 gezeigt. Zu diesem Zweck wurde der Stamm JM109 (pDHE19.2) im Kulturmedium TB bei 37°C mit 100 µg/ml Ampicillin (Tartof, Hobbs 1987) unter Schütteln angezogen. Bei einer OD<sub>600</sub> von 1,7 wurde die Kultur 1 : 200 in frisches TB-Medium, das zur Induktion der Nitritase 0,2% (w/v) L-Rhamnose enthielt, überimpft und bei 30°C unter Schütteln kulti-

65

# DE 198 48 129 A 1

viert. Nach 8 Stunden wurden die Zellen geerntet, mit 10 mM Na/K-Phosphatpuffer, pH 7,2, gewaschen, in demselben Puffer entsprechend einer OD<sub>600</sub> von 10 resuspendiert und nach Ultraschallbehandlung aufgeschlossen.

## Beispiel 5

5

### Bestimmung der Nitrilase-Aktivität des rekombinaten Stamms E. coli JM109 (pDHE19.2)

#### 1. Herstellung der Zellen

10 E. coli JM109 (pDHE19.2) wurde bei 37°C für die Dauer von 6 Stunden in TB-Medium + 100 µg/ml Ampicillin unter Schütteln kultiviert. Bei einer OD<sub>600</sub> von 4 wurde mit 100 ml dieser Vorkultur ein 10l-Fermenter mit 81 frischem TB-Medium + 100 µg/ml Ampicillin + 2 g/l L-Rhamnose beimpft. Der pH, die Temperatur, der Luftstrom und die Rührgeschwindigkeit lagen bei 7,2, 30°C, 300 l/h und 400–650 upm. Nach 16 Stunden wurden die Zellen geerntet. Zu diesem Zeitpunkt betrug die optische Dichte bei 600 nm 18, was einem Zellrockengewicht von 7,8 g/l entsprach.

15

#### 2. Bestimmung der spezifischen Aktivität gegenüber Mandelonitrit

Die Zellen wurden wie in Beispiel 1 beschrieben gewonnen und in 10 mM Na/K-Phosphatpuffer, pH 7,2 gewaschen. 2 mg Zellrockengewicht wurden in 1 ml 10 mM Na/K-Phosphatpuffer, pH 7,2, resuspendiert und die Reaktion durch Zugabe von 8,3 mM Mandelonitrit gestartet. Die Reaktion wurde unter Schütteln bei 40°C durchgeführt. Die Kinetik wurde über Probenentnahme und anschließende Hochleistungsfüssigkeitschromatographie (ODS Hypersil) verfolgt. Dabei wurde Mandelonitrit, Benzaldehyd, Mandelsäureamid und Mandelsäure bestimmt. Die Bildungsgeschwindigkeit von Mandelsäure beträgt 403 U/g Zellrockengewicht bei einem Umsatz von 30%, wobei 1 U definiert ist als 1 µmol Mandelsäure, das pro Minute bei 40°C gebildet wird.

25

## Beispiel 6

### Synthese von R-Mandelsäure über Verseifung von Mandelonitrit mit Hilfe von E. coli JM109 (pDHE19.2) in Suspension

30 In einem Volumen von 11 10 mM Na/K-Phosphatpuffer, pH 7,2, der den Stamm E. coli JM109 (pDHE19.2) in einer Konzentration von 2 g/l enthielt, wurde bei 40°C unter Rühren mit einem Blattrührer über 10 Stunden Mandelonitrit in einer Konzentration von 1,3 g/l zudosiert. Die Dosierung wurde über den Nitrit-Verbrauch reguliert. Die Bildungsgeschwindigkeit von R-Mandelsäure wurde wie in Beispiel 5 beschrieben verfolgt. Die Ergebnisse sind in Fig. 4 dargestellt.

35

## Beispiel 7

### Gewinnung von R-Mandelsäure über Extraktion aus dem Reaktionsansatz der Mandelonitrit-Verseifung durch E. coli JM109 (pDHE19.2) in Suspension

40

Der in Beispiel 6 erhaltene, wässrige Reaktionsansatz an Mandelsäure wurde von den Zellen über Zentrifugation befreit, mit einer Säure auf pH 2 gestellt und dreimal mit Methyltertiärbutylether (MTBE) extrahiert. Nach Abdampfen des organischen Lösungsmittels des Mandelsäureextraktes wurden die so erhaltenen, weißen Mandelsäurekristalle rückgelöst und auf chemische und optische Reinheit über Hochleistungsfüssigkeitschromatographie untersucht. Die chemische Reinheit lag bei 99%, die optische Reinheit der R-Mandelsäure bei 97,4% ee.

45

## Beispiel 8

### Gewinnung von R-Mandelsäure über Kühlungs-Kristallisation aus dem Reaktionsansatz der Mandelonitrit-Verseifung durch E. coli JM109 (pDHE19.2) in Suspension

Der in Beispiel 6 erhaltene, wässrige Reaktionsansatz an Mandelsäure wurde von den Zellen über Zentrifugation befreit, unter Erwärmung und Rührung auf 40% des Ausgangsvolumens aufkonzentriert und mit einer Säure auf pH 2 gestellt. Durch Abkühlung im Eisbad wurde die Mandelsäure auskristallisiert und die so erhaltenen, weißen Mandelsäurekristalle über eine Nutsche abgesaugt und getrocknet. Die Kristalle wurden rückgelöst und über Hochleistungsfüssigkeitschromatographie auf chemische und optische Reinheit untersucht. Die chemische Reinheit lag bei 99,1%, die optische Reinheit der R-Mandelsäure lag bei 99,8% ee.

60

## Beispiel 9

60

### Umsetzung verschiedener Nitrile

Mit dem E. coli Stamm (siehe Beispiel 6) oder mit dem Ausgangsstamm Alcaligenes wurden verschiedene Nitrile umgesetzt. Die Alcaligenes-Zellen wurden in 400 ml Alcaligenes-Medium (siehe oben Medium A) bei 30°C und 160 Upm für 16 Stunden (= h) angezogen. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation (30 min, 4°C und 5000 Upm). Je 150 µl einer Zellsuspension wurden pro Well in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Die Platte wurde anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellpellets zweimal mit Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,42 g/l in Finnaqua, pH 7,2) gewaschen. Anschließend wurde die Substratlösung (150 µl) zupipettiert und die Zellen erneut resuspendiert. Je eine 12-er Reihe der

# DE 198 48 129 A 1

Mikrotiterplatte wurde mit einem Substrat versetzt. Als Kontrolle wurde eine Reihe mit der Substratlösung ohne Zellen genommen (= Leerwert).

Die Mikrotiterplatten wurden bei 30°C und 200 Upm für 2 Stunden im Schüttelinkubator belassen. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert und im Überstand die entstandene Menge an NH<sub>4</sub>-Ionen mit Hilfe der Biorek-Geräts bestimmt. Die Messung erfolgte bei 620 nm gegen eine Eichkurve, die mit verschiedenen NH<sub>4</sub>OH-Lösungen erstellt wurden war (siehe Fig. 5). Als Substrate wurden Mandelonitril (= 1), 2-Phenylpropionitril (= 2), 2-Phenylbutyronitril (= 3), Benzylcyanid (= 4), 4-Chlorbenzylcyanid (= 5), 4-Brombenzylcyanid (= 6), Propionitril (= 7), 2-Methylbutyronitril (= 8, 2-Cyanobutan), Geranonitril (= 9), Valeronitril (= 10), 3-Cyanpyridin (= 11), 3-Biphenyl-2-hydroxy-butyronitril (= 12), 4-Flourbenzylcyanid (= 13,4-Fluorophenylacetronitril) und  $\alpha$ -(3-Heptyl)-nitro-triacetonitril (= 14) verwendet. Die Substrate wurden 0,2 molar in Methanol angesetzt und von dieser Stammlösung ausgehend mit Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,42 g/l in Finn aqua, pH 7,2) auf 10 mM verdünnt. Die Zellsuspensionen wurden auf 2 g/l Biotrockenmasse standardisiert. Tabelle II gibt die Mittelwerte einer Mikrotiterplattenreihe bei der Umsetzung wieder.

Tabelle II

Umsetzung verschiedener Nitrile mit Nitrilase 1650

Substrat-Nr.	$\mu\text{mol/l}$	Aktivität	% Umsatz
1	2141,2	8,9	86,3
2	1001,1	4,1	70,2
3	24,4	0,1	44,3
4	2210,5	9,2	100
5	2136,3	8,9	100
6	1500,8	6,2	100
7	4,9	0,02	NA
8	-	-	NA
9	-	-	NA
10	113,4	0,47	NA
11	-	-	NA
12	-	-	NA
13	2222,9	9,2	100
14	84,8	0,35	44,1

Fig. 6 gibt die Ergebnisse der Umsetzung als Aktivitätswerte wieder.

DE 198 48 129 A 1

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALGEMEINE INFORMATION:

5 (i) ANMELDER:

- (A) NAME: BASF Aktiengesellschaft
- (B) STRASSE: Carl-Bosch-Strasse 38
- (C) ORT: Ludwigshafen
- (D) BUNDESLAND: Rheinland-Pfalz
- (E) LAND: Bundesrepublik Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: D-67056

10 15 (ii) ANMELDETITEL: Verfahren zur Herstellung chiraler  
Carbonsaeuren aus Nitrilen mit Hilfe einer Nitrilase oder  
Mikroorganismen, die ein Gen fuer die Nitrilase enthalten

20 (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 9

25 (iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

30 (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

35 (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1071 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppel
- (D) TOPOLOGIE: linear

40 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

45 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

50 (vi) URSPRUNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Alcaligenes faecalis
- (B) STAMM: 1650

55 (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 1..1071

55 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

ATG CAG ACA AGA AAA ATC GTC CGG GCA GCC GCC GTA CAG GCC GCC TCT  
Met Gln Thr Arg Lys Ile Val Arg Ala Ala Ala Val Gln Ala Ala Ser

60 1 5 10 15

48

# DE 198 48 129 A 1

CCC AAC TAC GAT CTG GCA ACG GGT GTT GAT AAA ACC ATT GAG CTG GCT Pro Asn Tyr Asp Leu Ala Thr Gly Val Asp Lys Thr Ile Glu Leu Ala	20	25	30	96
				5
CGT CAG GCC CGC GAT GAG GGC TGT GAC CTG ATC GTG TTT GGT GAA ACC Arg Gln Ala Arg Asp Glu Gly Cys Asp Leu Ile Val Phe Gly Glu Thr	35	40	45	144
				10
TGG CTG CCC GGA TAT CCC TTC CAC GTC TGG CTG GGC GCA CCG GCC TGG Trp Leu Pro Gly Tyr Pro Phe His Val Trp Leu Gly Ala Pro Ala Trp	50	55	60	192
				15
TCG CTG AAA TAC AGT GCC CGC TAC TAT GCC AAC TCG CTC TCG CTG GAC Ser Leu Lys Tyr Ser Ala Arg Tyr Tyr Ala Asn Ser Leu Ser Leu Asp	65	70	75	240
				20
AGT GCA GAG TTT CAA CGC ATT GCC CAG GCC GCA CGG ACC TTG GGT ATT Ser Ala Glu Phe Gln Arg Ile Ala Gln Ala Ala Arg Thr Leu Gly Ile	85	90	95	288
				25
TTC ATC GCA CTG GGT TAT AGC GAG CGC AGC GGC AGC CTT TAC CTG Phe Ile Ala Leu Gly Tyr Ser Glu Arg Ser Gly Gly Ser Leu Tyr Leu	100	105	110	336
				30
GGC CAA TGC CTG ATC GAC GAC AAG GGC GAG ATG CTG TGG TCG CGT CGC Gly Gln Cys Leu Ile Asp Asp Lys Gly Glu Met Leu Trp Ser Arg Arg	115	120	125	384
				35
AAA CTC AAA CCC ACG CAT GTA GAG CGC ACC GTA TTT GGT GAA GGT TAT Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Val Phe Gly Glu Gly Tyr	130	135	140	432
				40
GCC CGT GAT CTG ATT GTG TCC GAC ACA GAA CTG GGA CGC GTC GGT GCT Ala Arg Asp Leu Ile Val Ser Asp Thr Glu Leu Gly Arg Val Gly Ala	145	150	155	480
				45
CTA TGC TGC TGG GAG CAT TTG TCG CCC TTG AGC AAG TAC GCG CTG TAC Leu Cys Cys Trp Glu His Leu Ser Pro Leu Ser Lys Tyr Ala Leu Tyr	165	170	175	528
				50
TCC CAG CAT GAA GCC ATT CAC ATT GCT GCC TGG CCG TCG TTT TCG CTA Ser Gln His Glu Ala Ile His Ile Ala Ala Trp Pro Ser Phe Ser Leu	180	185	190	576
				55
TAC AGC GAA CAG GCC CAC GGC CTC AGT GCC AAG GTG AAC ATG GCT GCC Tyr Ser Glu Gln Ala His Ala Leu Ser Ala Lys Val Asn Met Ala Ala	195	200	205	624
				60
TCG CAA ATC TAT TCG GTT GAA GGC CAG TGC TTT ACC ATC GCC GCC AGC Ser Gln Ile Tyr Ser Val Glu Gly Gln Cys Phe Thr Ile Ala Ala Ser	210	215	220	672
				65

DE 198 48 129 A 1

AGT GTG GTC ACC CAA GAG ACG CTA GAC ATG CTG GAA GTG GGT GAA CAC Ser Val Val Thr Gln Glu Thr Leu Asp Met Leu Glu Val Gly Glu His 225                    230                    235                    240	720
5	
AAC GCC CCC TTG CTG AAA GTG GGC GGC GGC AGT TCC ATG ATT TTT GCG Asn Ala Pro Leu Leu Lys Val Gly Gly Ser Ser Met Ile Phe Ala 245                    250                    255	768
10	
CCG GAC GGA CGC ACA CTG GCT CCC TAC CTG CCT CAC GAT GCC GAG GGC Pro Asp Gly Arg Thr Leu Ala Pro Tyr Leu Pro His Asp Ala Glu Gly 260                    265                    270	816
15	
TTG ATC ATT GCC GAT CTG AAT ATG GAG GAG ATT GCC TTC GCC AAA GCG Leu Ile Ile Ala Asp Leu Asn Met Glu Glu Ile Ala Phe Ala Lys Ala 275                    280                    285	864
20	
ATC AAT GAC CCC GTA GGC CAC TAT TCC AAA CCC GAG GCC ACC CGT CTG Ile Asn Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Lys Pro Glu Ala Thr Arg Leu 290                    295                    300	912
25	
GTG CTG GAC TTG GGG CAC CGA GAC CCC ATG ACT CGG GTG CAC TCC AAA Val Leu Asp Leu Gly His Arg Asp Pro Met Thr Arg Val His Ser Lys 305                    310                    315                    320	960
30	
AGC GTG ACC AGG GAA GAG GCT CCC GAG CAA GGT GTG CAA AGC AAG ATT Ser Val Thr Arg Glu Glu Ala Pro Glu Gln Gly Val Gln Ser Lys Ile 325                    330                    335	1008
35	
GCC TCA GTC GCT ATC AGC CAT CCA CAG GAC TCG GAC ACA CTG CTA GTG Ala Ser Val Ala Ile Ser His Pro Gln Asp Ser Asp Thr Leu Leu Val 340                    345                    350	1056
40	
CAA GAG CCG TCT TGA Gln Glu Pro Ser 355	1071
45	
(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:	
50	
(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA: (A) LÄNGE: 356 Aminosäuren (B) ART: Aminosäure (D) TOPOLOGIE: linear	
55	
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein	
60	
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:  Met Gln Thr Arg Lys Ile Val Arg Ala Ala Ala Val Gln Ala Ala Ser 1                    5                    10                    15	
65	
Pro Asn Tyr Asp Leu Ala Thr Gly Val Asp Lys Thr Ile Glu Leu Ala 20                    25                    30	

## DE 198 48 129 A 1

Arg Gln Ala Arg Asp Glu Gly Cys Asp Leu Ile Val Phe Gly Glu Thr				
35	40	45		
Trp Leu Pro Gly Tyr Pro Phe His Val Trp Leu Gly Ala Pro Ala Trp				5
50	55	60		
Ser Leu Lys Tyr Ser Ala Arg Tyr Tyr Ala Asn Ser Leu Ser Leu Asp				
65	70	75	80	10
Ser Ala Glu Phe Gln Arg Ile Ala Gln Ala Ala Arg Thr Leu Gly Ile				
85	90	95		15
Phe Ile Ala Leu Gly Tyr Ser Glu Arg Ser Gly Gly Ser Leu Tyr Leu				
100	105	110		
Gly Gln Cys Leu Ile Asp Asp Lys Gly Glu Met Leu Trp Ser Arg Arg				20
115	120	125		
Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Val Phe Gly Glu Gly Tyr				
130	135	140		25
Ala Arg Asp Leu Ile Val Ser Asp Thr Glu Leu Gly Arg Val Gly Ala				
145	150	155	160	
Leu Cys Cys Trp Glu His Leu Ser Pro Leu Ser Lys Tyr Ala Leu Tyr				30
165	170	175		
Ser Gln His Glu Ala Ile His Ile Ala Ala Trp Pro Ser Phe Ser Leu				
180	185	190		35
Tyr Ser Glu Gln Ala His Ala Leu Ser Ala Lys Val Asn Met Ala Ala				
195	200	205		40
Ser Gln Ile Tyr Ser Val Glu Gly Gln Cys Phe Thr Ile Ala Ala Ser				
210	215	220		
Ser Val Val Thr Gln Glu Thr Leu Asp Met Leu Glu Val Gly Glu His				45
225	230	235	240	
Asn Ala Pro Leu Leu Lys Val Gly Gly Ser Ser Met Ile Phe Ala				
245	250	255		50
Pro Asp Gly Arg Thr Leu Ala Pro Tyr Leu Pro His Asp Ala Glu Gly				
260	265	270		55
Leu Ile Ile Ala Asp Leu Asn Met Glu Glu Ile Ala Phe Ala Lys Ala				
275	280	285		
Ile Asn Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Lys Pro Glu Ala Thr Arg Leu				60
290	295	300		
Val Leu Asp Leu Gly His Arg Asp Pro Met Thr Arg Val His Ser Lys				
305	310	315	320	65

DE 198 48 129 A 1

Ser Val Thr Arg Glu Glu Ala Pro Glu Gln Gly Val Gln Ser Lys Ile  
325 330 335  
5 Ala Ser Val Ala Ile Ser His Pro Gln Asp Ser Asp Thr Leu Leu Val  
340 345 350  
10 Gln Glu Pro Ser  
355

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

15 (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
(A) LÄNGE: 39 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(D) TOPOLOGIE: linear  
20  
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid  
  
(iii) HYPOTHETISCH: NEIN  
25  
(iii) ANTISENSE: NEIN  
  
(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus  
30  
(vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:  
(A) ORGANISMUS: Alcaligenes faecalis  
(B) STAMM: 1650  
35  
(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:  
(B) CLON: Nitrilase  
  
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:  
40  
Met Gln Thr Arg Lys Ile Val Arg Ala Ala Ala Val Gln Ala Ala Ser  
1 5 10 15  
45 Pro Asn Tyr Asp Leu Ala Thr Gly Val Asp Lys Thr Ile Glu Leu Ala  
20 25 30  
Arg Gln Ala Arg Asp Glu Gly  
50 35

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

55 (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
(A) LÄNGE: 21 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(D) TOPOLOGIE: linear  
60  
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid  
  
(iii) HYPOTHETISCH: NEIN  
65  
(iii) ANTISENSE: NEIN

DE 198 48 129 A 1

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres

(vi) URSPRUNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Alcaligenes faecalis  
(B) STAMM: 1650

5

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

(B) CLON: Nitrilase

10

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Glu Glu Ala Pro Glu Gln Gly Val Gln Ser Lys Ile Ala Ser Val Ala  
1 5 10 15

15

Ile Ser His Pro Gln

20

20

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

25

(A) LÄNGE: 11 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(D) TOPOLOGIE: linear

30

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

35

(iii) ANTISENSE: NEIN

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres

(vi) URSPRUNGLICHE HERKUNFT:

40

(A) ORGANISMUS: Alcaligenes faecalis  
(B) STAMM: 1650

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

45

(B) CLON: Nitrilase

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

50

Glu Glu Ala Pro Glu Gln Gly Val Gln Ser Lys  
1 5 10

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 6:

55

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

60

(A) LÄNGE: 23 Basenpaare  
(B) ART: Nukleinsäure  
(C) STRANGFORM: Einzel  
(D) TOPOLOGIE: linear

65

DE 198 48 129 A 1

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

5 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

10 (vi) URSPRUNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Alcaligenes faecalis  
10 (B) STAMM: 1650

15 (vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

(B) CLON: Nitrilase

15 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

ATGCAGACNA GNAARATCGT SCG

23

20 (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

25 (A) LÄNGE: 20 Basenpaare  
(B) ART: Nukleinsäure  
(C) STRANGFORM: Einzel  
(D) TOPOLOGIE: linear

30 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

35 (iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRUNGLICHE HERKUNFT:

40 (A) ORGANISMUS: Alcaligenes faecalis  
(B) STAMM: 1650

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

(B) CLON: Nitrilase

45 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

TNGCSACNGA NGCRATCTTG

20

50 (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

55 (A) LÄNGE: 31 Basenpaare  
(B) ART: Nukleinsäure  
(C) STRANGFORM: Einzel  
(D) TOPOLOGIE: linear

60 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

65 (iii) ANTISENSE: NEIN

DE 198 48 129 A 1

(vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:  
 (A) ORGANISMUS: Alcaligenes faecalis  
 (B) STAMM: 1650

5

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:  
 (B) CLON: Nitrilase

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

10

TTAACATAT GCAGACAAGA AAAATCGTCC G

31

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 9:

15

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
 (A) LÄNGE: 32 Basenpaare  
 (B) ART: Nukleinsäure  
 (C) STRANGFORM: Einzel  
 (D) TOPOLOGIE: linear

20

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

25

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:  
 (A) ORGANISMUS: Alcaligenes faecalis  
 (B) STAMM: 1650

30

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:  
 (B) CLON: Nitrilase

35

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

40

AAGGATCCTC AAGACGGCTC TTGCACTAGC AG

32

Patentansprüche

1. Isolierte Nukleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid mit Nitrilaseaktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe:  
 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz,  
 b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz ableiten,  
 c) Derivate der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 95% Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne daß die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich reduziert ist.

2. Aminosäuresequenz codiert durch eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1.

3. Aminosäuresequenz nach Anspruch 2, codiert durch die in SEQ ID NO: 1 dargestellte Sequenz.

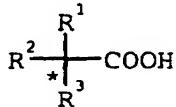
4. Nukleinsäurekonstrukt enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1, wobei die Nukleinsäuresequenz mit einem oder mehreren Regulationssignalen verknüpft ist.

5. Vector enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 4.

6. Mikroorganismus enthaltend mindestens eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder mindestens ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 4.

7. Mikroorganismus nach Anspruch 6, wobei es sich bei dem Mikroorganismus um ein Bakterium der Gattungen Escherichia, Pseudomonas oder Alcaligenes handelt.

8. Verfahren zur Herstellung von chiralen Carbonsäuren der allgemeinen Formel I



(I),

65

# DE 198 48 129 A 1

dadurch gekennzeichnet, daß man racemische Nitrile der allgemeinen Formel II



in Gegenwart einer Aminosäuresequenz gemäß Anspruch 2 oder 3 oder einem wachsenden, ruhenden oder aufgeschlossenen Mikroorganismus gemäß Anspruch 6 oder 7 umgesetzt und wobei mindestens 25 mmol Nitrit/h pro mg Protein oder 25 mmol Nitrit/h pro g Trockengewicht zu den chiralen Carbonsäuren umgesetzt werden, wobei die Substituenten und Variablen in den Formeln I und II folgende Bedeutung haben:

\* ein optisch aktives Zentrum

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> unabhängig voneinander Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkyl-, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-Alkenyl-, substituiertes oder unsubstituiertes Aryl-, Hetaryl-, OR<sup>4</sup> oder NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup> und wobei die Reste R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> und R<sup>3</sup> immer unterschiedlich sind,

R<sup>4</sup> Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkyl-, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-Alkenyl-, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-Alkenylcarbonyl-, Aryl-, Arylcarbonyl-, Hetaryl- oder Hetarylcarbonyl-, R<sup>5</sup> Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkyl-, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-Alkenyl-, Aryl- oder Hetaryl-.

20 9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß einer der Substituenten R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> oder R<sup>3</sup> OR<sup>4</sup> bedeutet.  
10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß einer der Substituenten R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> oder R<sup>3</sup> Aryl bedeutet.

11. Verfahren nach den Ansprüchen 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren in wäßriger Reaktionslösung bei einem pH zwischen 4 bis 11 durchgeführt wird.

25 12. Verfahren nach den Ansprüchen 8 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß im Verfahren 0,01 bis 10 Gew.-% Nitrit oder 0,01 bis 10 Gew.-% eines entsprechenden Aldehyds oder Ketons und 0,01 bis 10 Gew.-% Blausäure umgesetzt werden.

13. Verfahren nach den Ansprüchen 8 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren bei einer Temperatur zwischen 0°C bis 80°C durchgeführt wird.

30 14. Verfahren nach den Ansprüchen 8 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die chirale Carbonsäure über Extraktion oder Kristallisation oder Extraktion und Kristallisation in Ausbeuten von 60 bis 100% aus der Reaktionslösung gewonnen wird.

15. Verfahren nach den Ansprüchen 8 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die chirale Carbonsäure eine optische Reinheit von mindestens 90% ee besitzt.

35

Hierzu 6 Seite(n) Zeichnungen

40

45

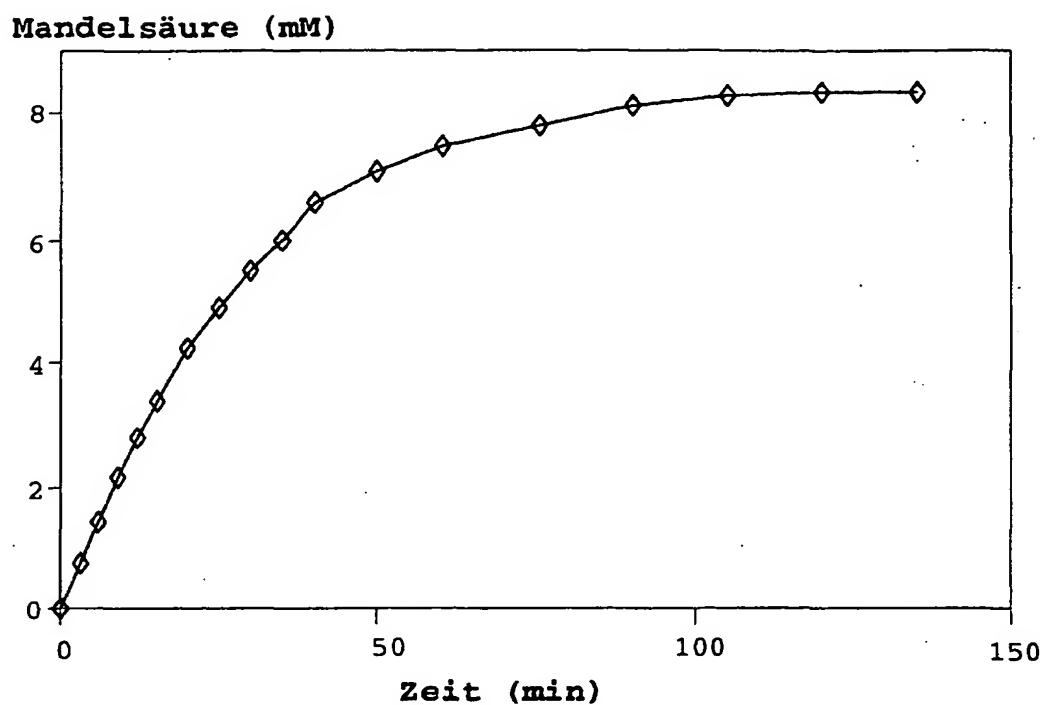
50

55

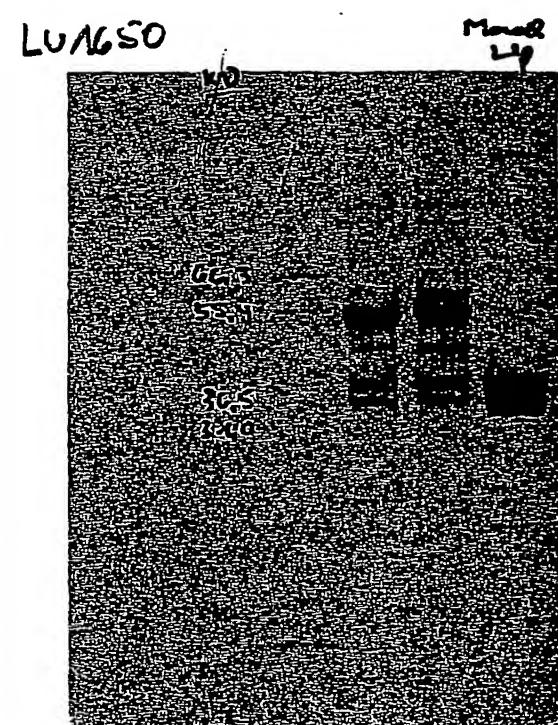
60

65

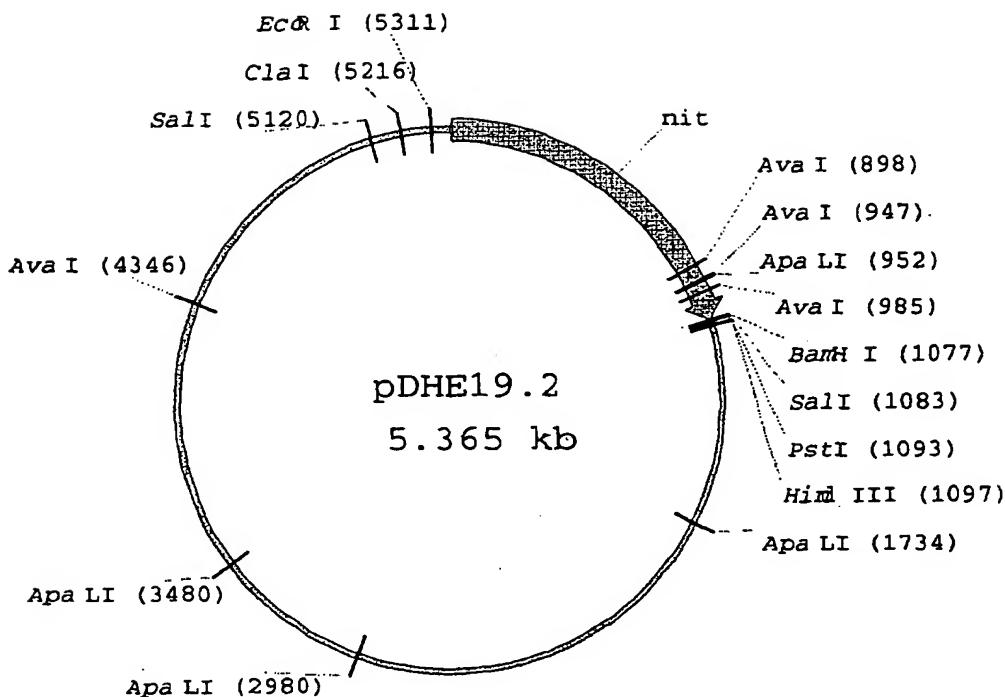
Figur 1

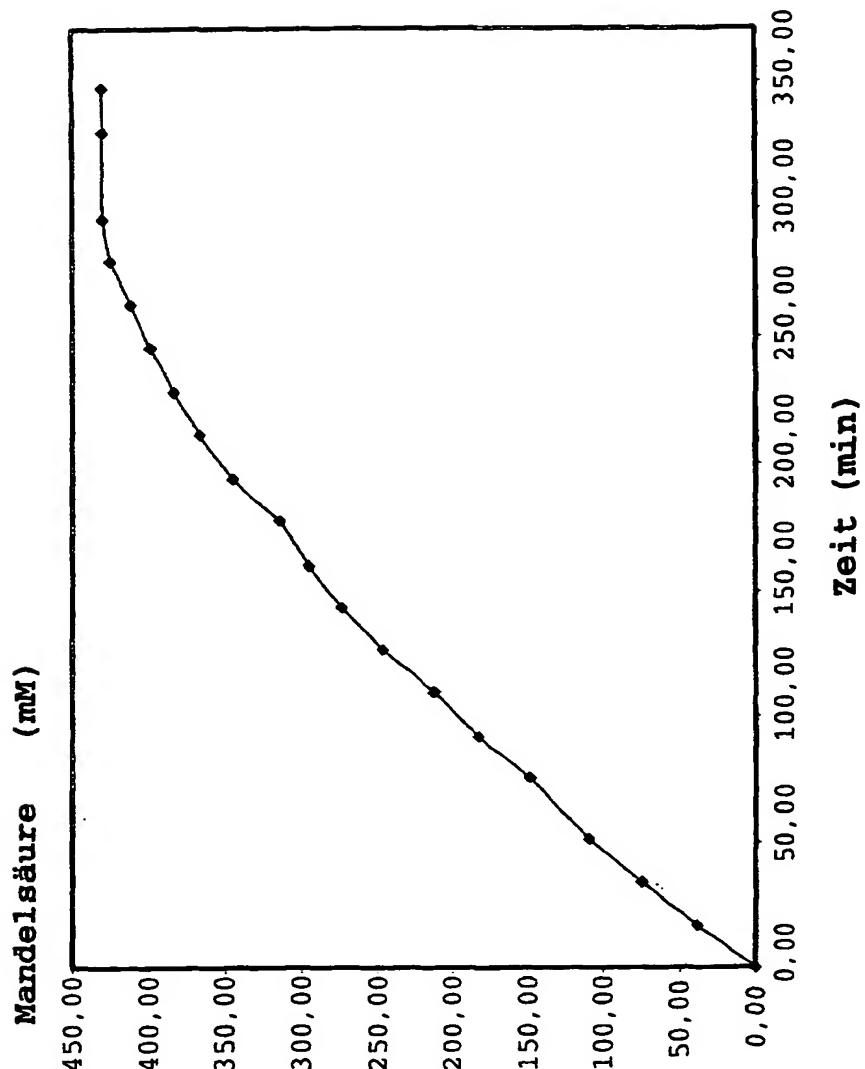


Figur 2

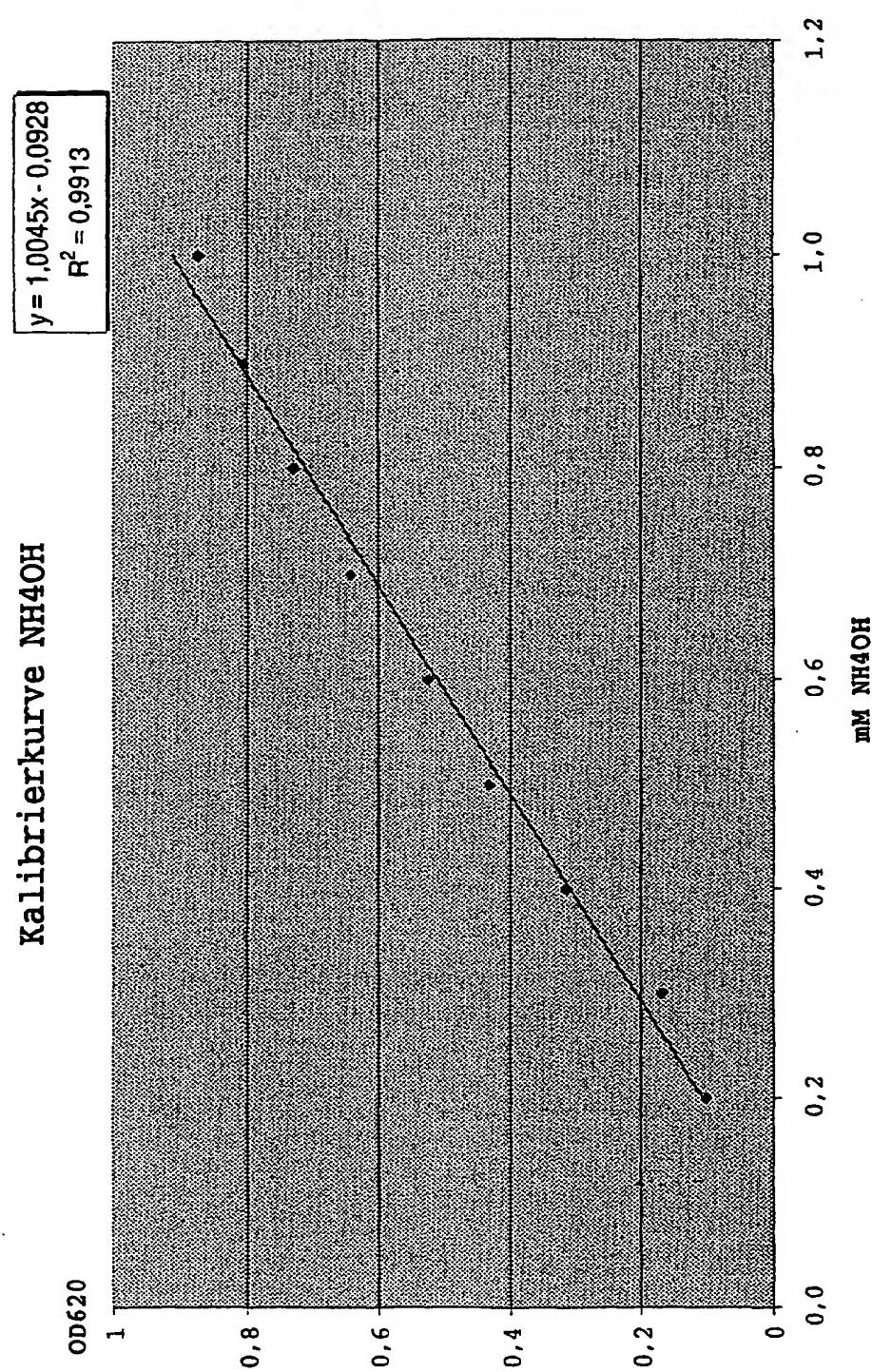


Figur 3

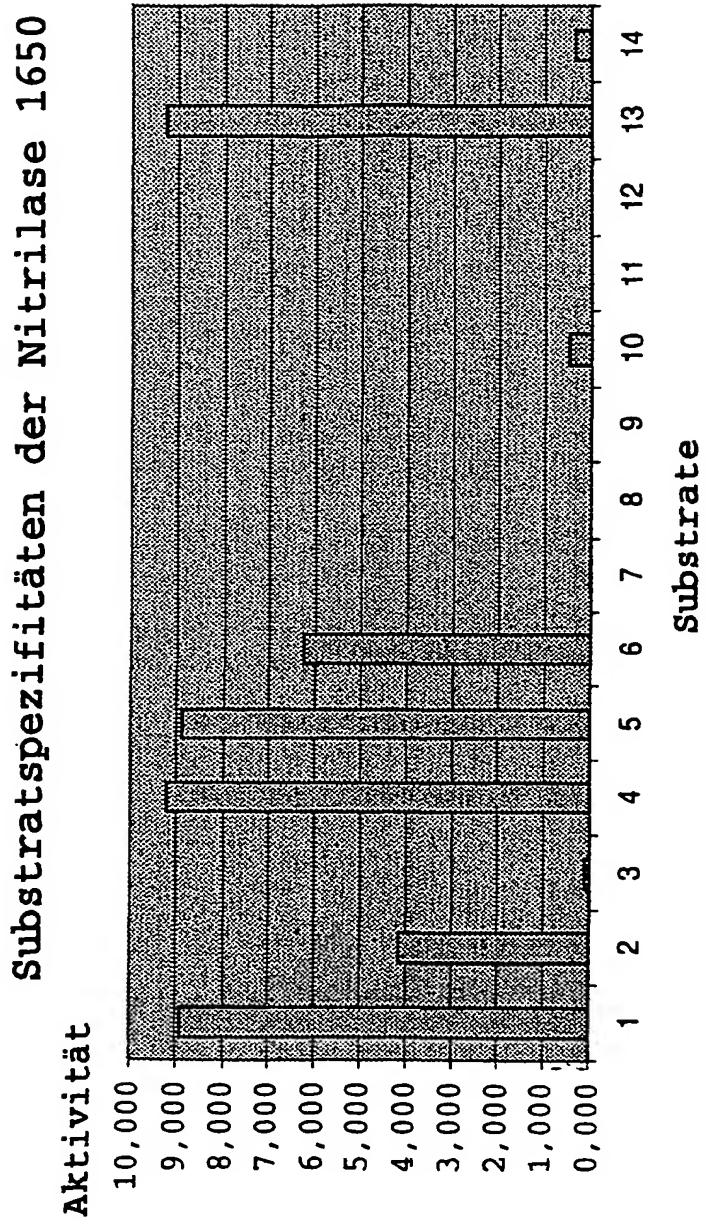




Figur 4



Figur 5



Figur 6

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT OR DRAWING
- BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- GRAY SCALE DOCUMENTS
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.  
As rescanning documents *will not* correct images  
problems checked, please do not report the  
problems to the IFW Image Problem Mailbox**

**This Page Blank (uspto)**